ORSAY
SÉRIE A,
N° D'ORDRE :
14

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR-INGÉNIEUR

PAR

Marie-France HUGEL

PREMIÈRE THÈSE

Sur les stérols du pollen

DEUXIÈME THÈSE

Proposition donnée par la Faculté

Soutenues le 12 décembre 1964 devant la Commission d'examen

MM. E. LEDERER — Président

M. FETIZON, M. VILKAS — Examinateurs

ORSAY
SÉRIE A,
N° D'ORDRE :
14

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR-INGÉNIEUR

PAR

Marie-France HUGEL

PREMIÈRE THÈSE

Sur les stérols du pollen

DEUXIÈME THÈSE

Proposition donnée par la Faculté

Soutenues le 12 décembre 1964 devant la Commission d'examen

MM. E. LEDERER — Président

M. FETIZON, M. VILKAS — Examinateurs

FACULTÉ DES SCIENCES, DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen.....M. ZAMANSKY

MM.	G. JULIA	T Analyse supérieure & algèbre supérieure
	PRENANT	T Anatomie et Histologie comparée
	GRASSE	T Evolution des êtres organisés
	PREVOST	T Chimie organique
	WYART	T Minérolo & Cristal.
	TEISSIER	T Zoologie
	MANGENOT	T Biol. Végét. (Orsay)
	AUGER	T Physique quantique et relativité
	MONNIER	T Physiologie générale
	PIVETEAU	T Paléontologie
	ROCARD	T Physique (ENS)
	CARTAN	T Mathématiques (ENS)
	LAFFITTE	T Chimie générale
	FAVARD	T Géométrie supérieure
	COULOMB	T Physique du globe
Mlle	COUSIN	T Biol. animale (SPCN)
	CHRETIEN	T Chimie minérale
	DRACH	T Zoologie
	KASTLER	T Physique ENS
	EPHRUSSI	T Génétique
	RIVIERE	T Géol. SPCN & Sédimentologie (Orsay)
	GAUTHERET	T Biologie Vég. (PCB)
	R. LUCAS	T Recherches Physiques
	A. THOMAS	T Biologie cellulaire
	ARNULF	T Optique appliquée
	MORAND	T Physique Enseignement
	SOLEILLET	T Physique (PCB)
	FORTIER	T Mécanique Exp. des Fluides
	PETIT	T Biologie maritime
	QUENEY	T Météor. & dynamique atmosphérique
	GALLIEN	T Embryologie
	EICHHORN	T Botanique
	DE CUGNAC	T Biologie Vég. (SPCN)
Mlle	CAUCHOIS	T Chimie Physique
	THELLIER	T Physique du globe
	L'HERITIER	T Biol. générale (Orsay)
	GRIVET	T Radioélectricité (Orsay)
	PONCIN	T Mécanique générale
	DUBREIL	T Arithm. & Théorie des Nombres
	QUELET	T Chimie organique
	CAGNIARD	T Géophysique appliquée
	CHAMPETIER	T Chimie macromolécul.
	CUVILLIER	T Micropaléontologie
	JUNG	T Géologie
	TRILLAT	T Miscroscopie et diffraction électro.
	WIEMANN	T Chimie organ. & struc.
	JACQUINOT	T Spectroscopie & Phys. céleste (Orsay)
	VASSY	T Physique de l'Atmosph.
	DESTOUCHES	T Théories Physiques
	AMIEL	T Chimie générale
	HOCART	T Minéralo & Cristallo.
	J.P. MATHIEU	T Physique Optique
	COUTEAUX	T Cytologie
	MAY	T Zoologie (Orsay)
	CHOQUET	T Théorie des fonctions et Topologie
	FELDMANN	T Biologie végét. marine
	GUINIER	T Physique des Solides (Orsay)
	JOST	T Physiologie comparée
	FORTET	T Calcul des Probabilité et Phys. mathémat.
	SCHWARTZ	T Calcul diff. & Intégral
	CHOUARD	T Physiologie végétale
	MALAVARD	T Aviation (Tech. Aéron.)
	BRELOT	T Calcul diff. & Intégr.
	NORMANT	T Synthèse organique
	BENARD	T Chimie minérale
	BUVAT	T Botanique (ENS)
	DUGUE	T Statistiques Mathém.
	SOULAIRAC	T Psychophysiologie
	ULRICH	T Physiol. Vég. Appliq.
	MARECHAL	T Optique théor. & Appli.
	KIRRMANN	T Théories chimiques
	CHADEFAUD	T Botanique
Mlle	LE BRETON	T Physiol. de la Nutrit.
	LELONG	T Application de l'analyse à la géométrie
	DEVILLERS	T Anatomie & Hist. Compar.
	EHRESMANN	T Topologie Algébrique
	FRANCON	T Physique (SPCN)
	GLANGEAUD	T Géographie Phys. & Géol.
	GODEMENT	T Mathématiques (MGP)
	PISOT	T Tech. Math. de la Phys.
	ROCH	T Géologie
	SCHATZMANN	T Astrophysique
	TERMIER	T Géologie générale
	ZAMANSKY	T Mathématiques générales
	LENNUIER	T Physique (MGP)
	RIZET	T Génétique (Orsay)
	ROUTHEER	T Géologie appliquée
Mme	TONNELAT	T Physique théorique
	DIXMIER	T Mathématiques (MPC)
	SOUCHAY	T Chimie générale
	AIGRAIN	T Electrotechnique générale
	BRUSSET	T Chimie systématique
	M. IEVY	T Physique théorique des hautes énergies (Orsay)
Mme	CHAIX	T Chimie biologique
Mme	HUREL-PY	T Biologie végét. (PCB)
	PIAUX	T Chimie (MPC)
	BRUN	T Mécanique théorique des fluides
	LEDERER	T Chimie biolog. (Orsay)
Mme	DUBREIL	T Mathématiques (Agrég.)
Mme	LELONG	T Mathématiques II (ENS)
	BELLAIR	T Géologie (SPCN)
	COTTE	T Physique électricité
	J.E. DUBOIS	T Chimie organique
	LAMOTTE	T Zoologie (ENS)
	A. MICHEL	T Chimie minérale (Orsay)
	OLMER	T Energétique générale
	ROUAULT	T Electricité (Orsay)
	GAUTHIER	T Mécanique appliquée
	BARCHEWITZ	T Chimie Physique
	BROSSEL	T Physique atomique
	BUSER	T Physiologie comparée
	CAMUS	T Physiologie Vég. (Orsay)
	CASTAING	T Physique II Thermo (Orsay)
	CURIEN	T Minéralo & cristallo.
	MOYSE	T Physiol. Végét. (Orsay)
	NOIROT	T Evolution des Etres Org.
	PANNETIER	T Chimie générale
	POSSOMPES	T Zoologie
	PULLMANN	T Chimie quantique
	TEILLAC	T Physique Nucl. & Radioactivité (Orsay)
	TONNELAT	T Biol. Physico-chim (Orsay)
	VILLE	T Econométrie
	WILLEMART	T Chimie PCB
	DODE	T Chimie (Orsay)
	FREYMANN	T Recherches Physiques
MM	GUINOCHET	T Biol. Vég. SPCN (Orsay)
	ROLLET	T Chimie minérale
Mlle	JOSIEN	T Chimie SPCN
	CHEVALLEY	T Géométrie algèb. et théorie des groupes
	ARNOULT	T Electronique (Orsay)
	CHAPELLE	T Physique I (Orsay)
	DELANGE	T Mathématiques I (Orsay)
	DENY	T Mathématique Géné (Orsay)
	GERMAIN	T Mécanique théor. des fluides
	G. LUCAS	T Géologie
	ALLARD	T Chimie Physique
	BERTHELOT	T Phys. des particules Fondamentales (Orsay)
	BRICARD	T Météor. et Physique de l'Atmosphère
Mme	ALBE-FESSARD	T Psycho-physiol.
	FRIEDEL	T Physique des solides (Orsay)
	M. JULIA	T Etudes des Molécules complexes
	LENDER	T Biol. Animale SPCN- (Orsay)
	MAGAT	T Physico-Chimie des radioéléments
Mlle	QUINTIN	T Electrochimie
	MONOD	T Chimie du métabolisme
	BENOIT	T Physiol. animale (Orsay)
	DE POSSEL	T Analyse numérique
	CHARLOT	T Chimie analytique
	LEMEE	T Ecologie Vég. (Orsay)
	GUERIN	T Chimie MPC (Orsay)
	M. CHATELET	T Chimie PCB
	JEAN	T Physique Nucl. (Orsay)
	MATTLER	T physique SPCN
	BERGERARD	T Zoologie (Orsay)
	BERTEIN	T Electronique (Orsay)
	BOUISSIERES	T Radiochimie
Mme	COUTURE	T Thermo & Méca. Physique
	ELLENBERGER	T Géologie des grandes régions du globe
	FRANC	T Biologie animale PCB
	SCHNELL	Botanique tropicale
	STOLKOWSKI	T Physiologie végétale
	ACHER	T Chimie Biologique
	BAUDOIN	Biologie animale PCB
	BEAUMONT	Biologie animale SPCN
	BLAMONT	T Géophysique-ionosphère
	BOURREAU	T Botanique
	D. CURIE	Physique MGP
	DURAND-DELGA	T Géologie
	FREON	T Chimie organique (Orsay)
	HELLER	T Physiol. végétale
	TORTRAT	T Calcul des Probabilités
	CAILLEUX	T Géologie (SPCN)
	MAGNAN	T Physique SPCN
	DAUDEL	T Mécanique ondulatoire appli. à la chimie
		Théor. & à la Phys. Nucléaire.
Mlle	FOURCROY	Biologie végét. SPCN
Mme	CHOQUET-BRUHAT	T Mécan. Analytique et Méca. céleste.
Mlle	VEIL	T Physiologie générale
	LWOFF	T Microbiologie
	SIESTRUNCK	T Mécan. Phys. & Expérim.
	LACOMBE	T Métallurgie des métaux Nucléaires (Orsay)
	BROCHARD	T Physique PCB (Orsay)
	CABANNES	T Mécanique générale
	LESIEUR	T Mathématiques I (Orsay)
	MAZET	T Méca. générale (Orsay) Géographie
		phys. et Géol. Dynamique
	CAIRE	Géographie phys. et Géol. Dynamique
	COMOLET	T Mécanique des Fluides
	CORABOEUF	T Physiol. animale (Orsay)
	DELLOUE	Physique de l'exosphère
	GORENFLOT	Botanique II (Orsay)
	HOUILLON	Biologie animale PCB
	J. JULLIEN	Chimie SPCN (Orsay)
	MALGRANGE	T Technique Math. de la Physique (Orsay)
	OLIVIER	Antropologie
	NOZERAN	T Botanique II (Orsay)
	BLANC-LAPIERRE	T Phys. ENS (Orsay)
	CHEVAUGEON	T Botanique (Orsay)
	KAHANE	T Mathématiques (Orsay)
	SAMUEL	T Mathématiques ENS féminines
	KOURGANOFF	T Astronomie (Orsay)
	THIRY	T Mécanique céleste
	ABELES	Physique SPCN
	AMAT	T Physique PCB
	AUBOIN	T Géologie
Mme	BENOIT-GUEUTAL	T Phys. Nucléaire et radioactivité (Orsay)
	BOUGIS	Biologie marine (Villefranche/Mer)
	BRUHAT	T Mathématiques MPC
	BRUNN	T Géologie historique (Orsay)
	CHABBAL	T Physique MGP (Orsay)
	DEHEUVELS	T Mathématique Propé.
	D'ESPAGNAT	T Physique théorique (Orsay)
	FURON	T Géologie SPCN
Mme	GANS	T Génétique
	GENEVES	Biologie végétale PCB
	GUILBERT	Physique (CUS Orléans)
	HUPE	T Pétrographie
	HOLLANDE	T Biologie générale
	LIONS	T Analyse numérique
	MAITTE	T Chimie PCB
	MEYER	Physique propédeutique
	NICOLAS	Géologie appliquée
	PANIGEL	Biologie générale
	RAVIER	Pétrographie
	ROSEAU	T Méca. théor. des fluides
	ROUBINE	T Electronique
	SILBER	T Chimie PCB
	UEBERSFELD	T Electronique
	YVON	T Théories Physiques
	HERVE	T Mathématiques
	NERON	T Mathémat. MPC (Orsay)
Mme	PECKER-WIMEL	T Astrophysique
	BALKANSKY	Physique MPC
	LE CORRE	T Electricité
	DELCROIX	T Physique théorique (Orsay)
	GOURDIN	Phys. Théor. des Hautes Energies (Orsay)
	LEHMANN	T Phys. Exp. des Hautes Energies (Orsay)
	NATAF	T Physique nucléaire et radioactivité (Orsay)
	ECHALIER	Biologie animale PCB
	BARRAUD	Physiologie cellulaire
	LIORET	Physiologie végét. Orsay
	DARS	Géologie struc. & Géol. appliquée
	CAMEFORT	T Botanique (agrégation)
	VICHNIEWSKY	T Mécanique industrielle
	BLAQUIERE	Electronique (Orsay)
	ARNOUS	T Physique théorique
	TATIBOUET	Chimie (CSU Orléans)
	MALLIAVIN	T Mathématique propé. Orsay
	GAUDEMAR	Chimie Propéd.
	PEREZ Y JORBA	Phys. Exp. des Hautes énergies (Orsay)
	DAVID	T Chimie (Agrég. Orsay)
	BROUSSE	T Mécanique théorique
	ROSCH	T Astronomie

Secrétaire Général..... R. POULLAIN

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

A mes parents.

Ce travail a été effectué dans le laboratoire de Monsieur le Professeur E. LEDERER (Institut de biologie physico-chimique, Paris et Institut de Chimie des substances naturelles, Gif-sur-Yvette) : je désire lui exprimer ma reconnaissance la plus sincère pour la constante bienveillance dont il a fait preuve à mon égard et les encouragements qu'il m'a donnés depuis ma venue dans son laboratoire.

J'adresse à Monsieur M. BARBIER (Maître de recherche au CNRS) mes remerciements les plus vifs pour l'aide et l'amitié qu'il m'a prodigués tout au long de mon travail.

Je voudrais remercier Monsieur le Professeur M. FETIZON pour les conseils qu'il m'a si souvent donnés et pour avoir accepté d'être membre de mon jury.

Je remercie Monsieur le Professeur M. VILKAS d'avoir, lui-aussi, accepté de faire partie de mon jury.

Je remercie tout particulièrement Monsieur H. AUDIER, dont l'amicale collaboration m'a été indispensable pour l'interprétation des résultats en spectrométrie de masse.

Je tiens à remercier Monsieur A. GAUDEMER pour l'interprétation pertinente qu'il a faite des spectres de RMN du pollinastanol.

J'adresse mes remerciements à Madame J. POLONSKY (Directeur scientifique au CNRS) et à Monsieur J. ASSELINEAU (Professeur à l'Université de Toulouse) qui ont guidé mes débuts dans la recherche.

Je remercie Monsieur J. LOUVEAUX (Directeur de la station de recherches apicoles, Bures-sur-Yvette) pour les nombreux échantillons de pollen qu'il a mis à ma disposition.

Que soient remerciés ici, tous ceux, qui de près ou de loin, m'ont aidée au cours de ce travail.

CHAPITRE I

BIBLIOGRAPHIE SUR LA CHIMIE DU POLLEN (*)

Le pollen, en tant que produit naturel très abondant, a intéressé les chercheurs depuis longtemps.

La technique de ramassage du pollen s'est beaucoup améliorée depuis quelques années. Il peut s'effectuer de deux manières :

- on laisse les abeilles butiner le pollen et l'on recueille les "pelottes" qu'elles font tomber dans la trappe à pollen (LOUVEAUX, 1955) : une trappe à pollen est une grille à travers laquelle elles doivent passer pour rentrer dans la ruche : les mailles ont un écartement tel, que l'abeille non chargée passe facilement, mais que la butineuse, au retour de la collecte, ne le peut plus. Les récoltes ne sont pas très importantes, car les abeilles apprennent rapidement à introduire leurs charges sans les laisser tomber dans la trappe. Comme les abeilles sont très spécialisées (elles ne butinent que sur une espèce de fleurs à la fois), le pollen qu'elles récoltent est à peu près pur : il suffit ensuite de trier les pelottes à la pince, suivant leur couleur (chaque pollen a sa propre couleur).

- on peut récolter le pollen mécaniquement (ou à la main), directement à partir des plantes : il faut, pour que le rendement de l'opération ne soit pas trop mauvais, disposer d'une espèce en grande quantité : les pollens obtenus sont rigoureusement purs.

L'on conçoit que ces deux modes de récoltes ne conduisent pas à de grandes quantités de pollens, si on les désire purs.

L'intérêt du pollen est grand en agriculture, en médecine ou du point de vue purement scientifique.

La littérature concernant le pollen est relativement pauvre, les travaux sont peu nombreux et si un assez grand nombre de constituants ont été isolés, peu ont été identifiés. De plus, si certains se retrouvent dans de nombreuses espèces, d'autres, au contraire, semblent être spécifiques d'un pollen donné .

Nous allons essayer de faire une courte classification des principaux constituants mentionnés..

Le tableau 1 donne quelques valeurs relatives à la composition générale de trois pollens étudiés par NIELSEN (1955) :

Tableau 1

	Zea mays	Alnus glutinosa	Pinus montana
azote	4,2	4,1	2,2
protéines	26,3	25,6	13,8
sulfates	4,9	2,4	3,0
phosphore	0,75	0,42	0,3
soufre	0,3	0,24	0,18
sucres réducteurs	7,3	8,4	2,7
sucres totaux	34,6	27,4	29,5

SHPAKOVA (1960 et 1962) a fait le même travail sur le pollen de vigne.

---

* Nous avons puisé les principaux renseignements de cette bibliographie dans les publications que LUNDEN (1956) et JOHRI (1961) ont consacré au pollen.

1 - Protéines et acides aminés :

Les teneurs en protéines que donnent ANDERSON (1922), ELSER (1930) et WEAVER (1941) sont très variables : 11 à 35 %.

Les abeilles semblent le plus souvent préférer les pollens riches en protéines : elles ne butinent pas le pollen de pin, qui en est particulièrement pauvre.

La recherche et l'étude de ces substances ne commencèrent réellement que lorsque la chromatographie sur papier devint d'un usage courant (AUCLAIR 1948).

Le pollen mixte renferme les acides aminés les plus répandus. Selon DE GROOT (1952) seuls seraient indispensables aux abeilles les acides aminés marqués d'un astérisque dans le tableau 2 :

Tableau 2 (NIELSEN 1955)

(les valeurs sont données en g/100 g de protéines)

	Zea mays	Alnus glutinosa	Pinus montana
alanine	+	+	+
ac. α-aminobutyrique	+	-	-
ac. aspartique	+	+	+
cystéine	+	+	+
ac. glutamique	+	+	+
glycocolle	+	+	+
histidine *	+	+	+
hydroxy-proline	+	-	-
iso-leucine *	+	+	+
leucine *	7,6	6,0	6,5
lysine *	5,0	4,7	5,1
méthionine *	1,6	4,4	1,5
phényl-alanine *	2,9	2,3	2,1
proline	+	+	+
sérine	+	+	+
thréonine *	+	+	+
tryptophane	0,6	0,8	0,8
tyrosine	1,9	1,7	2,1
valine *	+	+	+
arginine *	6,3	9,8	6,4

Ces trois espèces sont donc assez voisines par leur composition et leur teneur en acides aminés.

L'allergie que présentent certaines personnes au pollen (rhume des foins) semble être liée à la composition des protéines : 187 plantes sont allergissantes.

ABRAMSON (1947) isole par électrophorèse des pollens de certaines espèces sauvages, des fractions protéiniques incolores qui constituent la partie essentielle des extraits actifs ; ces protéines sont de bas poids moléculaire (M = 5 000) ; elles sont liées à des sucres (pentoses). Ce sont l'artéfoline, la trifidine et la pratésine.

A ces protéines peut être fixé un pigment : l'isorhamnétine (voir les pigments).

De même, STONE (1947) isole par dialyse une fraction de bas poids moléculaire possédant 50 % de l'activité allergissante : cette fraction contient des sucres liés à un polypeptide.

Les extractions faites par l'eau ou par des solutions salines conduisent à des mélanges extrêmement complexes : acides aminés libres, sucres, polypeptides et protéines liés à des pigments.

Presque tous les travaux effectués sur les fractions protéiniques ont été faits sur des pollens ayant un grand pouvoir allergissant : on ne connait presque rien sur la composition des protéines des autres espèces.

VIRTANEN (1955) a fait une étude comparée entre la composition de la feuille et celle du pollen et il a pu dire que le pollen contient plus de proline et d'acide pipécolique que les feuilles et moins de citrulline. La synthèse de la proline se ferait à partir de l'acide glutamique et celle de l'acide pipécolique à partir de la lysine. Il isole aussi des acides aminés moins courants comme l'homosérine, l'acide γ-aminoadipique et des amides (asparagine, glutamine) ; ses recherches ont porté sur une dizaine de plantes différentes.

On signale aussi la présence d'acides nucléiques (IWANAMI 1959) (VASIL 1960) : 1,35 % calculé sur la substance sèche (SOSA 1954) ; celle de l'acide désoxyribonucléique n'a pu être mise en évidence par ces auteurs.

Nous avons pu détecter la présence d'ornithine dans un pollen mixte (HUGEL 1960).

2 - Sucres :

Ils sont abondants et semblent être d'un intérêt secondaire pour les abeilles. Ils sont en général liés aux protéines.

VON PLANTA (1885) signale la présence d'amidon et de saccharose. Ensuite ANDERSON (1922) isole des pentoses et des sucres réducteurs. La présence de ces derniers est d'ailleurs contestée par d'autres auteurs (SOSA 1954) : ils n'existeraient pas initialement sous cette forme mais sous forme d'holosides et de sucres polymérisés.

En effet, on ne trouve pas de sucres réducteurs dans le pollen récolté mécaniquement, mais uniquement dans le pollen récolté par les abeilles qui cimentent leurs pelottes par du miel ou du nectar riche en glucose et autres sucres réducteurs.

MOTOMURA (1963) étudie six pollens différents (dont celui de pin) ; il trouve essentiellement du glucose, du fructose et du saccharose (le pollen de pin est très riche en saccharose).

Vers 1949, KUHN mit en évidence la présence du lactose : c'était la première fois que ce sucre était trouvé dans le règne végétal.

Puis successivement, furent identifiés, grâce à la chromatographie sur papier, le fructose, le saccharose, le glucose, le raffinose et le stachyose (SANERO-UENO 1954).

VON EULER (1945) a trouvé à côté des acides nucléiques du ribose et du desoxyribose.

Nous avons pu mettre en évidence (HUGEL 1960) la présence de mannose, xylose et arabinose dans un pollen mixte, toujours grâce à la chromatographie sur papier.

Les sucres serviraient à la nourriture durant la croissance du tube pollinique : la vitesse de croissance est ralentie s'ils sont absents. S'il y a plus de glucose que de saccharose la germination est rapide : le saccharose se transforme en glucose juste avant la germination (IWANAMI 1959).

La pression osmotique est aussi contrôlée par la présence des sucres durant la germination (VASIL 1960).

3 - Lipides, acides gras, stéroïdes, alcools, hydrocarbures :

Suivant les différents auteurs, ANDERSON (1922), ELSER (1930), VIRTANEN (1955), SOSA (1952), la teneur des pollens en lipides varie de 1 à 20 %. En général ils considèrent que leur présence est très importante pour la nourriture des abeilles. Une grande variété de composés ont été isolés et identifiés à partir des extraits éthérés ou alcooliques de pollens. Après saponification des extraits on obtient :

- Une fraction non saponifiable ; dans laquelle on peut isoler :
  - des hydrocarbures saturés : tricosane (SOSA 1952)
    heptacosane et nonacosane (ANDERSON 1922),
  - des hydrocarbures insaturés : $C_{20}H_{40}$ et $C_{34}H_{68}$ (SPADA 1958),

- des alcools : ils sont en grand nombre, saturés et monohydroxylés (SOSA 1952 et SPADA 1958). NILSSON (1957) isole un mélange de n-tétracosanol, n-hexacosanol, n-octacosanol et les paraffines correspondantes, mélange qui fut résolu grâce à la spectrométrie de masse. MARIELLA (1952) trouve dans des variétés *d'Artemisia*, des alcools à haut poids moléculaire.

- des stérols : VON PLANTA (1885) isola du cholestérol, puis ANDERSON (1922) obtient plusieurs stérols et mélange de stérols. SOSA et SOSA-BOURDOUIL (1954) isolèrent 2 stérols insaturés, monohydroxylés, lévogyres ; nous avons pu identifier (1960) dans différents pollens le 24-méthylène cholestérol et d'autres stérols ayant les chaînes latérales du campestérol, β-sitostérol, fucostérol, cholestérol et desmostérol (1964).

- Une fraction acide :

on a pu isoler de l'acide palmitique : il se trouve sous forme de palmitate de phytostérol. ANDERSON (1922) décrit un mélange d'acides et SOSA (1952) isole un acide isomère de l'acide laurique ainsi qu'un acide ramifié.

CHING et CHING (1962) identifient un certain nombre d'acides : acides monocarboxyliques de C_{14} à C_{22} et quelques acides insaturés (acides oléique , linoléique etc...).

Après saponification et extraction par le réactif T de Girard, SOSA (1954) et NILSSON (1957) ont isolé des fractions cétoniques (n-tri, n-penta, n-hepta et n-nonacosanone, étudiées en spectrométrie de masse).

4 - Vitamines et hormones :

Les pollens sont très riches en vitamines du groupe B et pauvres en vitamines lipo-solubles.

ANDERSON (1922) isole de l'inositol, puis HAYDAK (1938) trouve de la vitamine E et signale un fait intéressant : la gelée royale, unique nourriture de la reine, ne contient pas de vitamine E.

PEARSON (1942) étudie plus spécialement l'acide pantothenique : il émet l'hypothèse que les abeilles synthétisent cette vitamine durant l'élaboration de la gelée royale.

VIVINO et PALMER (1944), les premiers, établirent une liste des vitamines présentes dans différents pollens (voir tableau 4). Ils démontrèrent que la richesse en vitamines varie au cours de l'année : durant l'été la niacine est très abondante et entre Juin et fin Septembre l'acide pantothenique atteint son maximum de concentration.

SEKINE (1950) a pu prouver, par des dosages biologiques faits sur des rats nourris au pollen de pin que celui-ci était exempt de vitamine A, B et D.

Puis WEYGAND (1950) isola l'acide folique et l'acide ascorbique.

NIELSEN et HOLSTROM (1957) ont isolé non seulement de l'acide folique mais encore des substances conjuguées de l'acide folique ainsi que des conjugases différentes de celles que l'on peut isoler du pancréas de poulet.

A la suite de VIVINO (1944), RIDI (1950) et NILSSON (1957) établirent une liste des principales vitamines présentes dans différents pollens :

Tableau 4

(teneurs en mμ/g pollen)

	VIVINO (1944)	RIDI (1950)	NILSSON (1957)
thiamine	6,31-10,80	4,91-5,63	
riboflavine	16,30-19,20	6,38-6,59	5,10-12,40
ac. nicotinique	132-210	79,30-87,50	40,70-82,70
pyridoxine			3,10-6,80
ac. pantothenique	16,00-27,60		4,20-14,20
biotine			0,52-0,69
ac. folique			
inositol (mg/g)			3-30

	VIVINO (1944)	RIDI (1950)	NILSSON (1957)
ac. ascorbique	152-176	530-640	
vitamine A_1	0	0	
vitamine D_2	0,20-0,60		
vitamine E_3	0,32	0	
vitamine K	0		

Quelques hormones ont été mises en évidence : en particulier l'oestrone isolée du palmier dattier par RIDI (1950).

Le même auteur signale la présence des hormones folliculino stimulante (FSH, 100 IU/10 g) et lutéinisante (LH, 10 IU/10g) (1960).

On signale de même la présence de substances de croissance (test Pisum positif): un des facteurs responsables pourrait être la 2-hydroxy-5-hydroxy-méthyl pyridine (REDMANN 1951).

FUKUI (1958) a pu identifier 3 substances de croissance : l'acide indol-acétique, le 3 éthyl-indolacétate et le 3 indol-acétonitrile.

5 - Enzymes, coenzymes :

Les multiples activités biochimiques du pollen en ont fait un champ d'action très riche pour l'étude des réactions enzymatiques.

ELSER (1930) signale la présence d'amylase, de saccharase, de catalase ; SOSA-BOURDOUIL (1939) étudie l'activité de la saccharase dans divers pollens.

Des études furent entreprises sur la respiration du pollen et sur la fermentation alcoolique qu'il peut subir : les résultats ont montré que cette fermentation est identique à celle provoquée par la levure.

On signale aussi la présence des déshydrogénases des acides lactique et succinique (OKONUKI 1951) et de systèmes cytochrome-oxydases (VON EULER 1945).

L'activité enzymatique est maximum au moment de la germination et les variations peuvent être considérables, dans une même espèce.

NAKAMURA (1951) a étudié l'action des phosphatases.

6 - Pigments :

Nous avons dit, plus haut, que l'on pouvait séparer, dans la trappe à pollen, les différents pollens, grâce à la couleur des pelottes faites par les abeilles : la coloration qu'elles présentent va du jaune pâle au vert, avec toutes les gammes d'orangés et de bruns. Les pigments isolés appartiennent à deux grandes classes :

- Celle des flavonoïdes :

HEYL (1919) isole un glucoside d'isorhamnétol : il émet l'hypothèse que cette substance joue probablement un rôle dans le processus de fertilisation.

Effectivement KUHN (1944) a montré que cet éther méthylique du quercétol (isolé du pollen de crocus) pouvait être un facteur déterminant du sexe des cellules reproductrices. Deux de ses dérivés ont été isolés : l'un se trouve dans les fleurs à long style, l'autre uniquement dans celles à style court.

- Celle des caroténoïdes :

Les pigments caroténoïdes isolés sont : l'α-carotène, le lycopène, la lutéine, la zéaxanthine et la crocétine (VON EULER 1945).

VIVINO (1944) isola des caroténoïdes et des xanthophyles dans les proportions suivantes :

50 à 150 mμ/g pour les carotènes,

140 à 400 mμ/g pour les xanthophyles.

VON EULER (1945) fit remarquer que les insectes récoltent généralement des pollens contenant des caroténoïdes, tandis que les pollens des fleurs fécondées par le vent sont riches en flavonoïdes.

7 - Activités biologiques du pollen :

Le pollen d'une certaine espèce de pin : *Pinus montana*, peut provoquer la sarcoïdose, affection voisine de la tuberculose par ses symptômes.

CUMMINGS (1958) pensait avoir décelé dans ce pollen deux des constituants que l'on trouve dans les fractions toxiques du bacille de Koch : l'acide α, ε-diaminopimélique et des acides α-ramifiés et β-hydroxylés (acides mycoliques) : cette hypothèse s'est révélée inexacte.

Par injections intraveineuses chez la souris, le pollen de pin provoque l'apparition de granulomes riches en phospholipides, acides gras ou polysaccharides (LINDNER 1963).

Le pollen a une action bactériostatique certaine : il détruit une partie de la flore intestinale (en particulier *Escherichia coli* (CHAUVIN 1952)).

Une nourriture à base de pollen peut provoquer un retard dans l'apparition des tumeurs, également chez la souris (ROBINSON 1948).

- Les pollénines ont été étudiées par ZETZSCHE (1931) : on groupe sous le nom de pollénines des substances mal définies qui se trouvent dans la membrane de nombreux pollens et dans les spores de Ptéridophytes.

Il a isolé une sporo-pollénine qui entrerait dans la composition de l'exine (l'exine est la partie la plus externe de la membrane entourant le grain de pollen, elle est essentiellement formée de cutine).

La proportion des pollenines est différente suivant que l'on s'adresse aux Gymnospermes (*Pinus sylvestris* 20 %) ou aux Angiospermes (*Coryllus avellana* 7,3 %).

8 - Constituants minéraux :

NIELSEN (1955), ELSER (1930), VON PLANTA (1885), VIVINO (1944) et RIDI (1950) ont analysé et déterminé les concentrations des constituants minéraux ; les valeurs (% des cendres) sont reportées dans le tableau suivant :

Tableau 5

potassium	20 à 40 %
magnésium	1 à 12 %
calcium	1 à 15 %
cuivre	0,05 à 0,08 %
fer	0,01 à 0,3 %
silicium	2 à 10 %
phosphore	1 à 20 %
soufre	1 %
chlore	0,8 %

Le bore joue un rôle important dans la germination (on l'a surnommé "substance de croissance inorganique") ; VASIL (1960) affirme qu'il forme des complexes avec les OH des sucres ; SPURR (1957) trouve aussi qu'il joue un rôle dans le métabolisme.

BIBLIOGRAPHIE

ABRAMSON H. A., 1947 - Chemical, physical and immunological properties of electrophoretically purified pollen extracts. Ann. Allergy, *5*, 1926.

ANDERSON J. R., 1923 - Composition of corn pollen. J. Biol. Chem. *55*, 611-628.

AUCLAIR J. L., JAMIESON C. A., 1948 - Qualitative analysis of amino-acids in pollen collected by bees. Science, *108*, 357-358.

BARBIER M., HUGEL M-F., LEDERER E., 1960 - Isolement du 24-méthylène cholestérol à partir du pollen de différentes plantes. Bull. Soc. Chim. Biol. *42*, 91-97.

CHAUVIN R., DEFROMONT C., LOUVEAUX J., VERGE J., 1952 - Sur une substance présente dans le pollen, qui s'oppose au développement de certaines bactéries. Compt. Rend. Soc. Biol. *146*, 645.

CHING M. T., CHING K. K., 1962 - Fatty acids in pollen of some coniferous species, Science, *138*, 890.

CUMMINGS M. M., HUDGINS P. C., 1958 - Chemical constituents of pine pollen and their possible relationships to sarcoidosis. Am. J. Med. Sci. *236*, 311-317.

ELSER E., GANZMULLER J., 1930 - Die Chemische Zusammensetzung einiger Blütenstaubarten. Z. Physiol. Chem. *194*, 21-23.

EULER H. VON, HELLER H., HUGBER K. G., 1948 - Nucleoproteid aus Pollen von Birke. Ark. Kem. Miner. Geol. 26_A, n° 21.

FUKUI H. N., TEUBNER F. G., WITTWER S. H., SELL H. M., 1958 - Growth substances in corn pollen. Plant Physiol. *28*, 457-466.

DE GROOT A. P., 1952 - Amino-acid requirements for growth of Honey-bees. Experientia *8*, 192-193.

HAYDAK M. H., PALMER L. S., 1938 - Vitamin E content of royal jelly and bee-bread. J. Econ. Entomol., *31*, 576-577.

HEYL F. W., 1919 - The yellow coloring substances of ragweed pollen. J. Am. Chem. Soc., *41*, 1 285-1 289.

HUGEL M-F., 1960 - Etude de quelques constituants du pollen. Thèse Ingénieur CNAM, Paris.

HUGEL M-F., VETTER W, AUDIER H., BARBIER M., LEDERER E. 1964 - Analyse des stérols du pollen par spectrométrie de masse. Phytochemistry, *3*, 7-16.

IWANAMI Y., 1959 - Physiological studies in pollen. Jour. Yokohama Munic. Univ. 116_c, 1-137.

JOHRI B. M., VASIL I. K., 1961 - Physiology of pollen. Bot. Rev., *27*, 325-381.

KUHN R., LOW I., 1949 - Ueber pflanzenphysiologische Spezifität von Quercetin Derivaten. Ber. *77*, 219-220.

KUHN R., MOEWUS F., LOW I., 1944 - Ueber ein Vorkommen von milchzucker im Pflanzenreich. Chem. Ber., *82*, 479-481.

LINDNER A., KUTKAM A. T., SOKATCH J. R., HAMMARSTEN J. F., 1963 - Experimental granuloma formation with pine pollen. Chem. Abst. *58*, 1789_a.

LOUVEAUX J., 1958 - Recherches sur la récolte du pollen par les abeilles. Thèse, Paris.

LUNDEN R., 1956 - Literature on pollen chemistry. Gran palynologica (N. S.) *1-2*, 3-21.

MARIELLA R. P., BERSTEIN T. B., AOSCHER A. L., 1953 - Some purification studies on ragweed pollen. Chem. Abst. *47*, 1 131.

MOTOMURA Y., WATANABE T., ASO K., Honey and pollen VI. The sugar composition of several kinds of pollens. Chem. Abst. *58*, $4\,811_d$.

NAKAMURA G. R., BECKER E. L., 1951 - Phosphatases of ragweed pollen. Arch. Bioch. Biophys. *33*, 78-89.

NIELSEN N., HOLSTROM B., 1957 - On the occurence of folic acid, folic acid conjugates and folic acid conjugases in pollen. Acta Chem. Scand. *11*, 101-104.

NIELSEN N., GROMMER J., LUNDEN P., 1955 - Chemical composition of pollen from some plants. Acta Chem. Scand. *2*, 1100-1106.

NILSSON M., RYHAGE R., SYDOW VON L., 1957 - Constituents of pollen. II. Long chain hydrocarbons and alcohols. Acta Chem. Scand. *11*, 634-639.

OKONUKI K. 1951 - The respiration of pollen. Chem. Abst. *45*, 3041_f.

PLANTA VON A., 1885 - Landwirtsch. Stat. Vers. *32*, 215.

PEARSON P. B., 1942 - Pantothenic acid content of pollen. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. *51*, 815-817.

REDEMANN C. T., 1951 - Biochemical studies of pollen from *Zéa mays*. Chem. Abst. *45*, 6249_e.

RIDI EL M. S., ABOUL-WAFA M. H., 1950 - General composition and vitamin content of the pollen grain of the date palm. Chem. Abst. *44*, 7492_a.

RIDI EL M. S., MOFTY EL A., KHALIFA K., SOLIMAN L., 1960 - Gonadotropic hormones in pollen grain of the date palm. Chem. Abst. *54*, 16533_c.

ROBINSON W., 1946 - Delay in appearence of palpable mammary tumours in C_3H mice following the ingestion of pollenized food. J. Natl. Cancer. Inst. *9*, 119-123.

SANERO, UENO, 1954 - Sugar in pollen of corn plants. Science, *24*, 90-91.

SEKINE H., LI T., 1950 - Biological studies of pollen. Chem. Abst. *44*, 2606_d.

SHPAKOVA V. M., 1960 - Chemical composition of grape pollen. Chem. Abst. *54*, 13284_i.

SHPAKOVA V. M., 1962 - Chemical composition of pollen from several flowers and grapes. Chem. Abst. *57*, 15511_i.

SOSA-BOURDOUIL C., SOSA A., 1954 - Recherches sur la composition du pollen de *Coryllus avellana L.* Bull. Soc. Chim. Biol. *36*, 393-404.

SOSA A., SOSA-BOURDOUIL C., 1952 - Etude de quelques constituants chimiques du pollen de *Coryllus avellana L.*, Compt. Rend. Acad. Sciences *235*, 971-973.

SOSA-BOURDOUIL C., 1939 - Note sur le pollen. Chem. Abst. *33*, 93604.

STONE G. C., HARKAVY J., BROOKS G., 1947 - Chemical investigation of giant ragweed pollen. Ann. Allergy, *5*, 546.

SPADA A., COPPINI D., MONZANI A., 1958 - Ricerce sul polline di *Cedrus deodora* et di *Cedrus atlantica*. Ann. Chim. (Rome) *48*, 181-187.

SPURR A. R., 1957 - The effect of boron on cell wall structure in celery. Am. J. Bot. *44*, 637-650.

VASIL I. K., 1960 - Studies on pollen germination of certain Cucurbitaceae. Am. J. Bot. *47*, 239-247.

VIVINO A. E., PALMER L. S., 1944 - The chemical composition and nutritional value of pollens collected by bees. Arch. Bioch. *4*, 129-136.

VIRTANEN A. E., KARI S., 1955 - Acides aminés libres dans le pollen. Acta Chem. Scand. *9*, 1548-1551.

WEAVER N., KUIKEN K. A., 1941 - Quantitative analysis of the essential amino-acids of royal-jelly and some pollens. J. Econ. Entomol. *44*, 635-638.

WEYGAND F., HOFMAN H., 1950 - Pollinenhalstoffe. I Mitteil. : Zucker, Pollinsäüre und Ascorbinsäure. Chem. Ber. *83*, 405-413.

ZETZCHE F., VICARI H., 1931 - Untersuchungen über die Membran der Sporen und Pollen (3). Helv. Chem. Acta, *14*, 58-62.

CHAPITRE II

PRINCIPALES TECHNIQUES UTILISÉES

A - METHODES CHROMATOGRAPHIQUES*

I - CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION

Découverte par le botaniste russe Tswett, cette méthode fut, pour la première fois utilisée à l'échelle préparative par KUHN et LEDERER (1931) et subit au cours des années de nombreuses modifications (REICHSTEIN 1938 et TISELIUS 1941) ; c'est une méthode très spécifique, universelle, très souple et très sensible. On peut s'en servir comme moyen d'isolement et de purification ou comme moyen d'identification.

L'analyse par élution progressive ou chromatogramme liquide s'appuie sur des théories d'équilibre (WILSON 1940) (elle suppose l'équilibre atteint instantanément entre la phase liquide et l'adsorbant) et sur des théories cinétiques (THOMAS 1948) (mécanisme de désorption et d'adsorption). Ces théories sont vérifiées expérimentalement par l'étude du volume de rétention (WEIL-MALHERBE 1943) et le calcul des vitesses de déplacement (MARTIN 1941).

La séparation dépend de la nature de l'isotherme, de la nature de l'adsorbant, de la vitesse de percolation, des dimensions de la colonne, de la température et de la nature des solvants.

A - Chromatographie sur colonne :

Nous avons utilisé comme adsorbant de l'alumine et de l'acide silicique :

a) alumine :

On la neutralise par de nombreux lavages à l'acide et à l'eau, puis on la sèche à 180° durant quelques heures ce qui nous donne une alumine très active.

b) acide silicique :

Nous avons employé de l'acide silicique Malindckrodt :

- tel quel :

C'est de cette manière que nous l'avons utilisé le plus souvent, nous avons toujours employé des solvants distillés et anhydres ; les produits sont élués dans l'ordre suivant :

esters ou carbures saturés	éther de pétrole
esters ou carbures insaturés	éther de pétrole/benzène
carbures aromatiques	benzène
alcools à haut poids moléculaire	benzène
stérols	benzène/éther
cétones	benzène/éther
acides	éther

---

* Etude faite d'après LEDERER (1959).

- désactivé :

Il s'agit alors d'une chromatographie de partage (voir p. 13).

B - Chromatographie sur plaques :

Cette méthode fut introduite par ISMAILOV et SHRAIBER (1940). DEMOLE (1958 et 1961) a rassemblé en deux revues les résultats obtenus par différents auteurs. C'est une chromatographie sur couche mince d'adsorbant : les substances ont tendance à donner des liaisons hydrogènes avec l'adsorbant, ceci est conditionné par :

- l'état électronique du groupement polaire,
- l'encombrement stérique de ce groupement.

On peut l'employer comme chromatographie d'orientation (permet de prévoir l'ordre de sortie des substances) ou comme chromatographie de contrôle (vérification de la pureté du produit). Nous l'avons aussi utilisé comme moyen de récupération de petites quantités en chromatographie préparative : c'est une méthode très commode et très rapide : il suffit, après développement, de recouvrir hermétiquement la partie centrale de la plaque et de révéler les bords, il ne reste plus ensuite qu'à détacher les bandes correspondantes aux taches apparues sur les côtés et à extraire avec un solvant approprié.

Le développement des plaques se fait de la même manière que pour les chromatographies ascendantes sur papier, dans un mélange de solvants tel que l'on ait en présence un solvant polaire et un autre non polaire : pour nos séparations nous avons utilisé essentiellement des mélanges pentane-acétate d'éthyle (9:1 8:2 7:3). Les R_f obtenus sont d'ailleurs aussi caractéristiques d'une substance que ceux obtenus sur papier.

KIRCHNER (1951) et STAHL (1956) ont décrit plusieurs adsorbants : nous avons utilisé deux sortes de mélange :

- pour les chromatographies préparatives : un mélange acide silicique-amidon de riz (28,5 g : 1,5 g).
- pour les chromatographies de contrôle : un mélange acide silicique : plâtre ordinaire finement tamisé (9:1) que l'on disperse dans l'eau.

Toutes les plaques ont été activées au four à 105° durant 3 heures avant l'emploi.

II - CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE

Elle a été mise au point par MARTIN et SYNGE (1941) : elle est basée sur des différences de coefficients de partage entre deux solvants. Elle se fait soit sur colonne, soit sur papier.

La distance parcourue par les substances dépend :

- du coefficient de partage entre les deux phases,
- du volume d'eau retenu par unité de surface,
- du volume de la phase mobile saturée par unité de surface.

Le $R_f = \frac{\text{déplacement du corps dissous}}{\text{déplacement du front du liquide}}$ dépend donc du coefficient de partage si les deux derniers facteurs sont constants.

ISHERWOOD (1951) et SERCHI (1953) ont démontré que le poids moléculaire et la conformation jouent un rôle.

a) chromatographie sur colonne :

Nous avons employé l'acide silicique Mallindcrockt saturé d'eau (1:1) que nous avons agité ensemble durant trois heures. Tous les solvants utilisés étaient saturés d'eau. Nous avons eu ainsi une bonne séparation des esters de stérols à partir d'extraits bruts.

b) chromatographie sur papier :

CONSDEN, GORDON et MARTIN (1944) sont les premiers à avoir décrit cette technique. Nous n'avons utilisé que :

- *des chromatographies radiales :*

D'après la méthode de RUTTER (1950) : dans une cuve appropriée on met une feuille circulaire ; à deux centimètres du centre on dispose les produits sur un cercle. Le centre de la feuille sert de point d'arrivée au solvant de développement. Ce mode de chromatographie nous a permis d'identifier les 2,4 dinitrophénylhydrazones obtenues après ozonolyse des stérols.

III - CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Cette méthode fut introduite par JAMES et MARTIN (1952) : il s'agit d'une chromatographie de partage entre une phase stationnaire liquide et une phase mobile gazeuse.

La colonne est assimilée à une série de plateaux et pour chacun d'eux on peut étudier la répartition des substances. On peut aussi calculer un R_f :

$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par le centre de la zône}}{\text{distance parcourue par la phase mobile}}$$

Plus la colonne sera longue et le diamètre petit, meilleure sera la séparation.

Une bonne séparation dépend de :

- la nature de l'isotherme de distribution,
- la manière d'introduire l'échantillon et la quantité introduite,
- la nature du gaz vecteur (gaz inertes),
- la nature du support (inerte et à grains calibrés),
- la quantité du liquide stationnaire,
- du débit de gaz (constant),
- la température de la colonne et du détecteur,
- la longueur de la colonne.

Les séparations s'effectuent sur une colonne remplie d'adsorbant que l'on chauffe à température constante ou à température programmée. Le gaz entraîne les produits les uns après les autres avec une vitesse constante. Leur passage sur le détecteur provoque une modification de l'enregistrement qui est transcrite sur papier sous forme d'un pic dans le cas d'un détecteur dit différentiel.

Il existe trois principaux types de détecteurs ; les catharomètres mesurent les variations de la conductivité thermique ; les détecteurs à flamme mesurent les variations d'ionisation de flamme ; enfin les détecteurs à source radioactive mesurent les différences d'ionisation d'un gaz rare (argon).

La surface d'un pic est proportionnelle à la quantité de substance introduite et les volumes de rétention sont caractéristiques d'un produit si l'on respecte les conditions d'expérience. On peut donc, théoriquement, identifier des substances inconnues par comparaison avec des substances connues ou par la méthode des témoins internes.

Nous avons travaillé avec un appareil Argon-Pye à source radio-active. Le gaz utilisé était l'argon et sa vitesse de déplacement était de 30 cm^3/minute.

Les phases stationnaires employées étaient du Chromosorb P + 5 % de SE 30 pour la séparation des stérols et du Chromosorb P + 5 % d'huile de silicone pour la séparation des acides gras.

Les températures étaient voisines de 200° pour la séparation des esters méthyliques et 220° pour celle des stérols.

Les colonnes étaient en verre d'une longueur de 112 cm et avaient un diamètre de 0,5 cm.

La quantité de mélange introduite était de 5 à 50 γ dans 1 μl d'éther.

Nous avons aussi utilisé un appareil (brevet du CNRS) à détection par ionisation de flamme afin de séparer et récolter les éthers méthyliques de stérols.

La colonne de métal (longueur 1,85 m, diamètre 4 mm) était remplie de Chromosorb W contenant 5 % de diéthylène glycol succinate ; le gaz employé était l'hélium.

B - METHODES SPECTROMETRIQUES

I - SPECTROMETRIE DE RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE*

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique spectroscopique qui utilise les radiations électromagnétiques de grande longueur d'onde : 50 cm environ.

Cette méthode fait intervenir les propriétés des noyaux d'hydrogène d'une molécule ; ceux-ci sont soumis à une double influence : celle d'un champ constant H_0 : champ directeur (il dispose le moment magnétique des protons suivant deux directions différentes qui correspondent à deux niveaux d'énergie différents) et celle d'un champ de radiofréquence H_1 qui fournit aux noyaux l'énergie nécessaire pour passer d'un niveau énergétique bas à un niveau plus élevé.

La fréquence de résonance est reliée à H_0 par la relation : $\nu = \frac{\gamma}{2} H_o$

Le champ magnétique appliqué au noyau n'est pas égal à H_0 car ce champ est modifié par le diamagnétisme des électrons qui l'entourent. Donc des atomes d'hydrogène ayant un environnement différent auront des champs magnétiques de résonance différents.

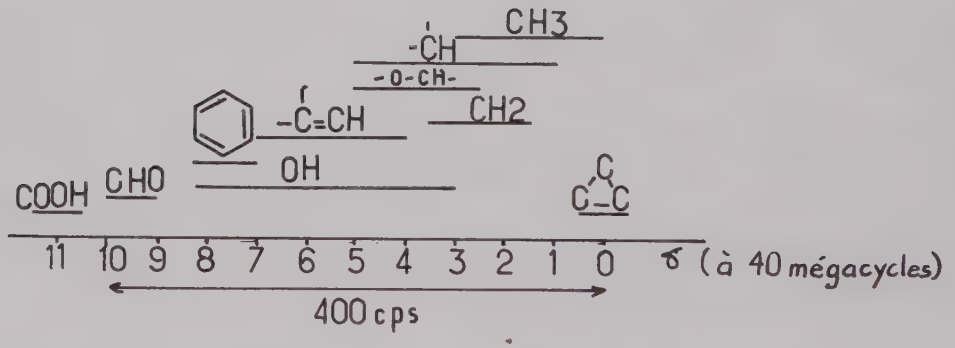
Un spectre de RMN sera constitué d'un certain nombre de pics de résonance. Le repérage de ces pics se fait par rapport à l'un d'eux pris arbitrairement comme zéro (raies méthyles du tétra méthylsilane).

Déplacement chimique :

On appelle déplacement chimique Δ d'un hydrogène (en cycles par seconde) la distance entre le centre d'une raie et le zéro.

Afin d'avoir un nombre indépendant de l'appareil on divise la valeur lue directement par la fréquence de l'appareil et on multiplie par 10^6 : on s'exprime ainsi en partie par millions (ppm) :

$$\delta = \frac{\Delta}{\nu_o} 10^6$$



Constante d'écran :

Le fait que les protons ne résonnent pas au même endroit est dû en partie au moment magnétique créé par les électrons qui s'oppose au H_0. Ce phénomène d'écran dépend :

- de la densité électronique :

Celle-ci dépendant de l'électronégativité des groupements auxquels sont liés les noyaux d'hydrogène : un proton lié à un groupement fortement électronégatif résonnera à une valeur du champ plus faible qu'un proton lié à un groupement moins électronégatif.

---

* Les renseignements suivants ont été puisés chez JACKMAN (1959), chez ROBERTS (1959) et chez GAUDEMER (1962).

- de l'anisotropie magnétique :

Des champs anisotropes peuvent être créés par les électrons π d'un carbonyle, d'une double liaison etc... Ils ont une influence même sur la constante d'un proton assez éloigné : l'influence de ces champs se transmet à travers l'espace et non pas par l'intermédiaire des liaisons chimiques.

Dans le cas d'un $\rangle C = O$ un proton qui se trouve dans le plan du carbonyle résonnera à une valeur du champ plus faible que le proton qui se trouve au dessus ; il en est de même pour $\rangle C = C \langle$.

L'intégration des pics d'un spectre permet d'autre part un décompte précis du nombre de protons dans chaque région du spectre : on peut ainsi connaître le nombre total d'hydrogène dans une molécule.

Couplage spin-spin :

Un spectre RMN a une structure fine provenant de l'intéraction entre les noyaux : soit un atome H_I porté par un atome de carbone, si le carbone voisin porte lui aussi un H_{II}, le champ H_ρ perçu par H_I variera suivant l'orientation du moment magnétique μ_{II} de H_{II} : le champ magnétique de résonance de H_I prendra deux valeurs correspondants à $H = H_\rho + J/2$ et $H = H_\rho - J/2$. On observera alors un doublet dont les deux raies sont séparées par J, constante de couplage entre les 2 protons.

En général quand 1 hydrogène est voisin de n hydrogènes on observera (n + 1) raies. Le nombre de raies permet de connaître le nombre d'hydrogènes voisins d'un hydrogène donné.

Constante de couplage :

L'écart entre les raies est appelé constante de couplage. J en première approximation est d'autant plus grand que les hydrogènes sont rapprochés : elle est indépendante du champ appliqué et dépend dans une large mesure de la géométrie des liaisons.

La connaissance de J permet d'avoir des renseignements sur la position dans l'espace des protons : isomérie cis-trans (la constante est plus grande pour les isomères trans), configuration axiale ou équatoriale des substituants du cyclohexane et déformation des cycles.

Sa valeur s'exprime en cycles par seconde (cps).

II - SPECTROMETRIE DE MASSE*

La spectrométrie de masse permet de déterminer le poids moléculaire d'un composé à l'unité près, d'en contrôler la pureté, de calculer dans le cas d'un mélange de substances homologues la proportion de chacun des constituants. Elle peut donner des indications sur les groupements fonctionnels présents et sur le squelette.

Une molécule à l'état de vapeur et sous pression réduite (10^{-7} mm Hg), bombardée par des électrons de faible énergie peut fournir des particules chargées positivement. Ces particules après avoir été initialement accélérées par un champ électrique sont déviées par un champ magnétique (de 60 à 90°). Ces ions passent par une fente dans un collecteur. Il y a ensuite amplification du signal électrique ; c'est cette variation d'amplitude qui est transcrite sur papier.

L'énergie des électrons de bombardement peut être réglée à différentes valeurs mais doit rester constante.

Le champ électrique appliqué peut varier de 400 à 4 000 volts.

On caractérise cet ion par le rapport de sa masse (m) à sa charge (e). Cet ion étant instable se fragmente lui-aussi.

La fragmentation est facteur de :

- l'énergie nécessaire pour rompre une liaison,
- la stabilisation de l'ion et des facteurs la gouvernant,
- la stabilisation de la charge neutre.

Il existe deux sortes de rupture :

a) <u>sans transfert d'hydrogène</u> : l'ion est stabilisé sans réarrangement par :

---

* Les principes de ce bref exposé ont été puisé chez BIEMANN (1962) et chez BORY (1964).

α) *effet inductif :*

La rupture s'effectue, en général, au voisinage du carbone le plus substitué : un ion carbonium primaire est moins stable qu'un ion carbonium secondaire ou tertiaire.

β) *effet mésomère :*

- stabilisation par les électrons π : la rupture se fait en β-γ d'une liaison :

  - allylique :

$$R - CH = CH-CH_2 - R' \longrightarrow R - CH = CH - CH_2^+ + R^\cdot$$

  - benzylique

- stabilisation par les électrons p :

Ils ne sont pas engagés dans une double liaison et ces ruptures sont fréquentes quand il y a des atomes d'oxygène, de soufre, d'azote etc... Ce sont les cas :

  - des amines :

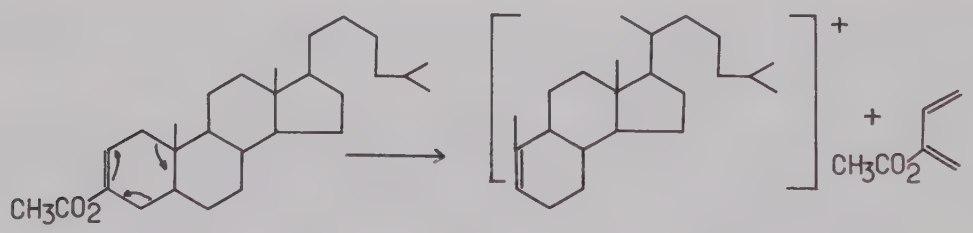
$$R - CH_2 - N\begin{matrix}CH_3\\CH_3\end{matrix} \longrightarrow CH_2 = {}^+N\begin{matrix}CH_3\\CH_3\end{matrix} + R^\cdot \quad (m/e = 58)$$

  - des cétones :

$$R - \underset{\underset{O}{\|}}{C} - CH_3 \longrightarrow CH_3 - C^+ = O \text{ très stable } (m/e = 43)$$

γ) *Retro Diels :*

Parfois deux liaisons semblent se rompre simultanément, c'est le cas d'un transfert circulaire dans un cycle hexa-atomique si la double liaison est parallèle à la jonction des cycles :

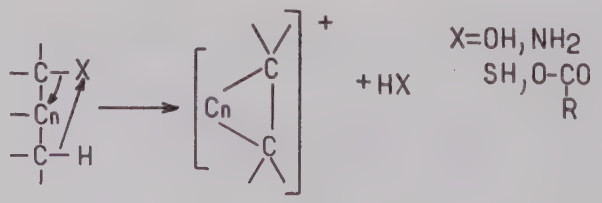


On appelle cette coupure "Retro Diels Alder" (REED 1958 et BIEMANN 1962).

b) avec réarrangement d'un hydrogène : ces ruptures sont de trois types :

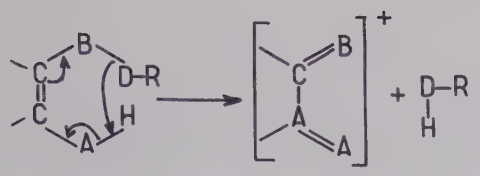
α) *élimination :*

C'est probablement ce type de mécanisme qui provoque le départ d'eau dans les alcools :

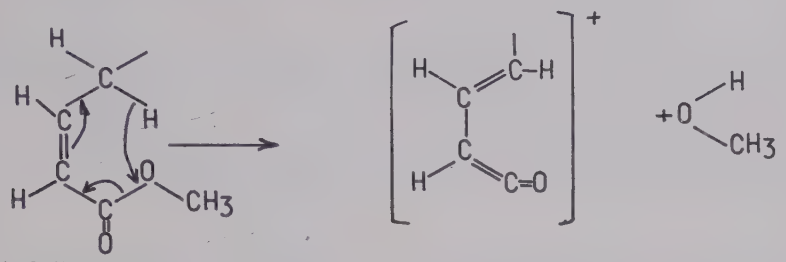


β) *transfert électronique circulaire :*

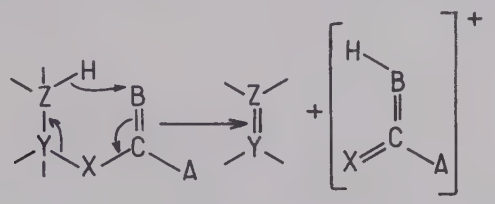
- induit pas une double liaison carbone-carbone :



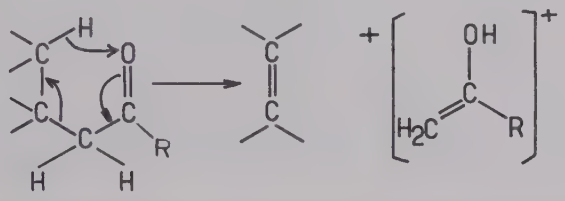
Ce mécanisme intervient dans la rupture d'esters α-β éthyléniques :



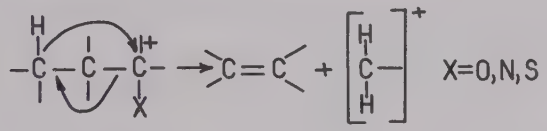
- induit par une double liaison carbone-hétéroatome :



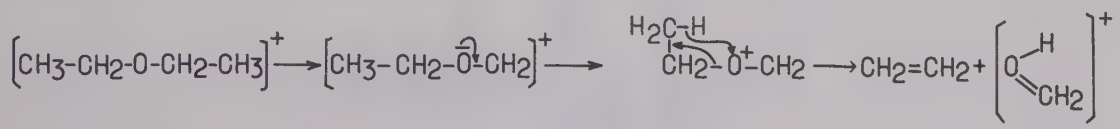
Ce mécanisme intervient dans la rupture d'esters d'acide gras :



γ) *transfert d'un hydrogène sur un centre positif stabilisé par un hétéroatome :*



ou transfert d'un hydrogène sur un centre positif formé par une liaison π carbone-hétéroatome : ce type de rupture s'observe généralement dans les spectres d'éthers, d'amines substituées et de thioéthers :



Le réarrangement dit de Mac Lafferty, réarrangement qui joue un rôle important dans la fragmentation de certains cétostéroïdes et donne des pics caractéristiques, procède lui aussi d'un tel transfert d'électrons.

Applications aux stérols :

De nombreuses communications sont parues sur la spectrométrie de masse des stérols :

- détermination de la chaîne latérale :

Les études furent faites par DE MAYO (1956) et RYHAGE et STENHAGEN (1960) ; elles nous ont permis de faire l'étude complète des stérols du pollen (Chapitre III p. 29 et Chapitre VII p. 53).

- étude des céto-stéroïdes :

L'influence des cétones sur la fragmentation a été étudiée dans le laboratoire de Djerassi (BUDZIKIEWICZ 1961 et WILLIAMS 1963).

- étude des stéroïdes aromatiques :

Une étude très détaillée de ces stéroïdes a été publiée par DJERASSI (1962).

- étude de l'influence de certains groupements :

La présence de groupements éthylène cétals (FETIZON et AUDIER sous presse) ou énols acétates (AUDIER et FETIZON 1963) induit des coupures différentes suivant que l'on ait des substituants ou non (AUDIER et FETIZON 1963).

- étude des 3 cétones et des cétones α éthyléniques :

Se trouve condensée en deux publications, une de DJERASSI (communication personnelle) et une d'AUDIER et FETIZON (1964).

III - DICHROISME CIRCULAIRE (DJERASSI 1960) :

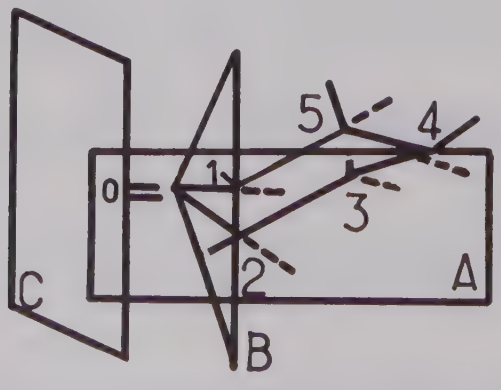
Des dérivés cétoniques substitués présentent dans leur courbe de dispersion rotatoire (rotation prise tout au long du spectre et qui varie avec la longueur d'onde) des maximums d'absorption qui sont anormaux : c'est ce que l'on appelle l'effet Cotton : il représente l'ensemble des phénomènes associés au chromophore dans son domaine d'absorption.

Au même endroit se présente le dichroïsme circulaire qui est la différence entre les coefficients moléculaires ε_g et ε_d pour des vibrations polarisées circulairement à gauche ou à droite : Δ_ϵ a même signe que l'effet Cotton. Le signe de Δ_ϵ, dans le cas des cyclohexanones, peut être prévu par la règle empirique de l'octant (MOFFIT 1961) : on divise l'espace en huit octants au moyen de trois plans $A_{(x,z)}$, $B_{(y,z)}$, $C_{(x,y)}$ qui se coupent. On peut l'énoncer ainsi : le signe de la contribution qu'apporte 1 atome en un point $P_{(x,y,z)}$ est de même signe que celui du produit de ses coordonnés x, y, z.

L'étude pratique en fut faite sur des cyclohexanones (à cause de leur faible distortion) de forme chaise.

En pratique ne sont importants que les octants délimités par la coupure des cycles A et B (le plan C ne touche que le groupement C=O) :

- $A_{(z,x)}$: vertical passe par C_1 et C_4 ; on y trouve les substituants de C_4,

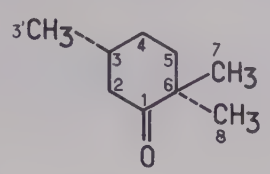


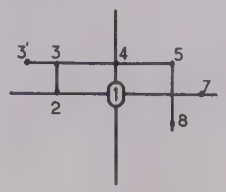
- $B_{(y,z)}$: horizontal passe par C_1, C_2 et C_6 ; on y trouve les substituants de C_2 et C_6 s'ils sont équatoriaux.

On projette sur un système plan le noyau en plaçant à la jonction des axes le C=O, comme si l'ensemble était vu par un observateur placé à l'infini, à travers ce chromophore.

Le sens de la contribution apportée par les atomes est indiqué dans le schéma ci-contre.

N'apportent une contribution positive ou négative que les atomes placés hors des axes s'ils n'ont pas de symétrique dans l'octant opposé ; exemple :





dans ce cas seuls les substituants 3' et 8 peuvent influencer le signe de la rotation ; tous deux étant dans les octants positifs le signe du dichroïsme sera fortement positif (+ 81).

On peut arriver à calculer la contribution des substituants :

- axiaux C_2, axiaux et équatoriaux C_5 : positif,
- axiaux C_6, axiaux et équatoriaux C_3 : négatif.

VELLUZ, LEGRAND et GROSJEAN (1960 et 1961) ont appliqué cette étude aux stéroïdes et en particulier à l'étude des 3-céto-stéroïdes méthylés en diverses positions (2, 4, 8 ou 10) : ceci permet quelquefois d'éclaircir la position d'un substituant.

On peut, si l'on connaît la conformation d'une substance, en déterminer la configuration absolue et vice-versa.

On peut donc prévoir la valeur du dichroïsme (et par suite le signe de l'effet Cotton) et l'aspect des courbes à partir d'une molécule ; OURISSON (1963) a pu ainsi dresser le tableau suivant :

- les 3-cétones, méthylées en 10 (ou non), en 2,2 et 10, en 8 et 10, en 4, 10 et 8 ont un dichroïsme positif voisin de 1.
- les 3-cétones, di-méthylées en 4, méthylés en 10 (ou non), non méthylée en 8 ont un dichroïsme négatif voisin de 0,3.
- les 3-cétones, tri-méthylées en 4,4 et 8 présentent l'aspect de vagues, l'une faiblement négative voisine de 0,02, l'autre fortement positive voisine de 0,75.

Inversement à partir d'une courbe on peut éliminer certaines positions des substituants. Il est évident que plus un substituant est proche du groupement chromophore plus sa contribution est importante.

C - METHODES ANALYTIQUES

Microanalyses :

Tous les dosages de carbone, hydrogène ont été fait dans les laboratoires de micro-analyse du CNRS à Gif-sur-Yvette.

Spectres infra-rouge :

Ils ont été fait en suspension dans le nujol ou tel quel sur un infracord Perkin-Elmer, ou en solution dans le sulfure de carbone (ou le tetrachlorure de carbone) sur un appareil Unicam SP 100 à prismes de chlorure de sodium et réseau (600 et 1 200 lignes/cm^{-1}).

Spectres ultra-violet :

Ils ont été fait en solution dans l'hexane ou l'alcool sur un appareil enregistreur Perkin Elmer.

Pouvoirs rotatoires :

Ils ont été mesuré dans le chloroforme, en lumière monochromatique de sodium (raie D), sur un appareil Hilger, dans un tube de 1 dm de longueur ou avec une cellule de 0,5 cm^3 sur un Quick polarimètre Roussel de chez Jouan.

Spectres de masse :

Ils ont été fait par le Dr. Vetter et Mr. Audier sur un appareil Atlas CH_4 ; température et source d'ions : 260° ; tension d'ionisation 70 et 10 ev. ; température d'injection 220°.

Spectres de résonance magnétique nucléaire :

Ils ont été enregistrés par Mme Allais sur un appareil Varian A-60. Les déplacements chimiques sont exprimés en (ppm) par rapport à la raie du tétraméthylsilane prise comme raie de référence.

Mesure du dichroïsme circulaire :

Elle a été faite à Strasbourg, dans les laboratoires du Professeur Ourisson par Melle. Hermann sur un dichrographe de chez Jouan.

Poids moléculaire des substances acides :

Le calcul des équivalents moléculaires peut être fait par titrage avec la potasse alcoolique sur quelques milligrammes de produit que l'on compare avec un témoin de poids moléculaire connu titré dans les mêmes conditions. Pour ces titrages nous avons utilisé une ultra micro-burette Gilmont.

Ozonolyse :

Pour l'ozonisation des stérols nous avons utilisé l'appareil suivant (figure 1).

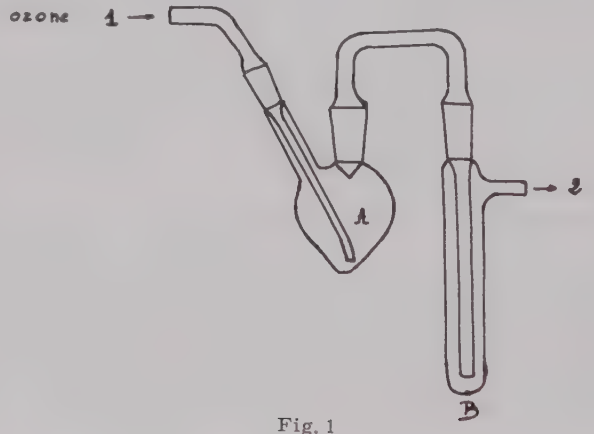


Fig. 1

On place les substances, dissoutes dans l'acide acétique, dans le ballon A (refroidi par de la glace). Bien qu'il y ait peu de risques d'entraînement, on dispose en B un piège contenant de l'eau. L'ozone arrive en 1 et sort en 2. Nous avons travaillé de deux manières :

a) soit en présence d'un gros excès d'ozone, la réaction est très rapide et nous avons recueilli les aldéhydes formés dans une solution de chlorhydrate de 2,4 dinitro phénylhydrazine, après un entraînement à la vapeur.

b) soit en présence d'une quantité mesurée d'ozone, pour cela nous en avons fait le dosage de la manière suivante :

On dissout 2 g d'iodure de potassium dans un mélange de 10 cm^3 d'eau et de 10 cm^3 d'acide acétique, on règle arbitrairement le débit d'oxygène à l'entrée, le débit d'ozone à la sortie, et le voltmètre sur des valeurs moyennes ; on laisse circuler le gaz un certain temps ; on ajoute à la solution acétique 5 cm^3 d'acide sulfurique (2N) ; on fait des prises d'essai de 5 cm^3 que l'on dose

au thiosulfate (0,01 N), (ce qui correspond à 0,24 mg d'ozone/cm³) en présence de thiodène ; on arrive à avoir ainsi la quantité d'ozone passant par minute. Nous avons utilisé cette méthode pour préparer le 24-céto cholestérol à partir du 24-méthylène cholestérol.

Réactions colorées :

- Formation de 2,4-dinitrophénylhydrazones (CHERONIS 1957) :

Cette réaction est applicable à tous les aldéhydes et cétones ; elle est cependant plus facile à obtenir avec les aldéhydes et α-cétoesters qu'avec les aldéhydes et cétones substitués.

Cette réaction peut être transformée en réaction quantitative : il y a formation d'un précipité qui va du jaune au rouge.

On peut l'employer dans l'alcool et l'acide sulfurique ou bien dans l'eau et l'acide chlorhydrique .

- Réaction de Liebermann-Burchard (JAVILLIER 1949) :

Elle caractérise généralement les stérols possédant un hydroxyle en 3, β-équatorial et une double liaison en 5-6 ; la présence d'une chaine en 17 n'est pas obligatoire ; les céto-stérols et les stérols saturés donnent le plus souvent une réaction négative. Il y a apparition d'une coloration verte si l'on ajoute à une solution chloroformique d'un stérol un peu de mélange d'anhydride acétique-acide sulfurique (9:1).

- Réaction de CARR et PRICE (1926) :

Cette réaction est caractéristique des substances insaturées : il y a apparition d'une coloration allant du jaune au violet avec le furane, l'acide abiétique etc.., bleu avec les caroténoïdes, rose violacé avec les stérols (même s'ils sont saturés), si l'on ajoute à une solution chloroformique d'une de ces substances un peu de chlorure d'antimoine dans le chloroforme.

Cette réaction nous a permis de faire des révélations de chromatoplaques de stérols : on pulvérise une solution contenant 20 g de trichlorure d'antimoine dans 33 cm³ de chloroforme et l'on chauffe ensuite fortement.

D - DISTILLATION

Distillation dans un tube à boules :

On introduit la substance à distiller dans un tube chauffé par un bain d'air à parois de mica. On fait le vide dans le tube, avant de chauffer progressivement le bain d'air. Les produits distillent dans de petites boules situées hors du bain. La distillation terminée on coupe le tube entre les boules.

BIBLIOGRAPHIE

AUDIER H., DIARA A, DURAZO M., FETIZON M., FOY P., VETTER W., 1963 - Orientation de la fragmentation en spectrométrie de masse par introduction de groupements fonctionnels. I Bull. Soc. Chim. France, 2827-2830.

AUDIER H., FETIZON M., VETTER W., 1963 - Orientation de la fragmentation en spectrométrie de masse par l'introduction de groupements fonctionnels. II Bull. Soc. Chim. France, 1971-1974.

AUDIER H., FETIZON M., VETTER W., 1964 - Orientation de la fragmentation en spectrométrie de masse par l'introduction de groupements fonctionnels. III Bull. Soc. Chim. France, 415-418.

AUDIER H., BOTTIN J., DIARA A., FETIZON M., GOLFIER M., VETTER W., 1964 - Orientation de la fragmentation en spectrométrie de masse par l'introduction de groupements fonctionnels, IV, sous presse.

BIEMANN K., 1962 - Die Anwendung der Massenspektrometrie in der organischen Chemie, insbesondere zur Strukturaufklärung von Naturstoffen. Ang. Chem., 79, 102-115.

BIEMANN K., 1962 - Mass spectrometry (Mac Graw Hill, New-York).

BORY S., 1964 - Stéréochimie de composés obtenus par cyclisation de diterpènes bicycliques, (Thèse, Paris).

BUDZIKIEWICZ H., DJERASSI C., 1961 - Mass spectrometry in structural and stereochemical problems (1). J. Am. Chem. Soc., 1430-1439.

CARR F.H., PRICE E., 1926 - Colour reactions attributed to vitamin A. Bioch. J., *20*, 497-501.

CHERONIS N.D., ENTREKIN J.B., 1957 - Semi-microqualitative analysis, 493 (Inters. Publ., New-York).

CONSDEN R., GORDON A.H., MARTIN A.P.J., 1944 - Qualitative analysis of proteins. Bioch. J. *38*, 224-232.

DEMOLE E., 1958 - Applications de la microchromatographie d'adsorption sur couches minces. J. Chrom., *1*, 24-34.

DEMOLE E., 1961 - Progrès récents de la microchromatographie sur couches minces. J. Chrom. *6*, 2-21.

DJERASSI C., 1960 - Optical rotatory dispersion (Pergamon Press, Londres).

DJERASSI C., WILSON J.M., BUDZIKIEWICZ H., CHAMBERLIN J.W., 1962 - Mass spectrometry in structural and stereochemical problems XIV. J. Am. Chem. Soc., *84*, 4544-4552.

GAUDEMER A., 1962 - La résonance magnétique nucléaire appliquée à la détermination des structures des molécules. Ann. Chim., 7, 409-415.

GROSJEAN M., LEGRAND M., 1960 - Appareil de mesure du dichroïsme circulaire dans le visible et l'ultra-violet, C. Rend. Acad. Sciences., *251*, 2150-2152.

ISHERWOOD F.A., JERMYN M.A., 1951 - Relation between the structure of sugars and their behavior on the paper chromatogram. Biochem. J., *48*, 515-524.

ISMAILOV N.A., SHRAIBER M.S., 1940 - A drop chromatographic method of analysis and its utilisation in pharmacy. C. Abst., *34*, 855_8.

JACKMAN L.M., 1959 - Applications of nuclear magnetic resonance spectroscopy in organic chemistry (Pergamon Press, Londres).

JAVILLIER, 1949 - Traité de chimie organique de Grignard, *16*, 853.

JAMES A.T., MARTIN A.P.J., 1952 - Gas liquid partition chromatography. Separation and microestimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoïc acid. Biochem. J., *50*, 679-690.

JAMES A.T., MARTIN A.P.J., 1954 - Gas liquid chromatography analysis and identification of volatile material, Brit. Med. Bull., *10*, 170-176.

KIRCHNER J.G., MILLER J.M., KELLER G.J., 1951 - Separation and identification of some terpenes by a new chromatographic technique, Anal. Chem., *23*, 420-425.

KUHN R., LEDERER E., 1931 - Zerlegung des Carotins in seine Komponenten. Ber. 64, 1349-1357.

LEDERER E. et Coll., 1959 - Chromatographie en chimie organique et biologique (Masson, Paris).

MAYO DE P., REED R.I., 1956 - The application of the mass spectrometer to steroïd and triterpenoïd chemistry, Chem. Ind., 1481-1482.

MARTIN A.P.J., SYNGE R.L.M., 1941 - A new form of chromatogram employing two liquid phases. Biochem. J., *35*, 1358-1368.

MOFFIT W., WOODWARD R.B., MOSCOWITZ A., KLYNE W., DJERASSI C., 1961 - Structure and the optical rotatory dispersion of saturated ketones. J. Am. Chem. Soc., *83*-4013-4018.

REED R.I., 1958 - Electron impact and molecular dissociation of some steroïds and triterpenoïds, J. Chem. Soc., *3*, 3432-3436.

REICHSTEIN T., EUW VON J., 1958 - Isolierung der Substanzen Q (Desoxy-corticosteron) und R sowie weiterer Stoffe. Helv. Chem. Acta, *21*, 1197-1210.

ROBERTS J.D., 1959 - Nuclear magnetic resonance. Applications to organic chemistry (Mac Graw Hill, New-York).

RUTTER L., 1950 - Some applications of a modified technique in paper chromatography. Analyst, *75*, 37-42.

RYHAGE R., STENHAGEN E., 1960 - Mass spectrometry in lipid research. J. Lip. Res. *1*, 361-390.

SERCHI G., 1953 - Relation between the structure of amino-acids and the chromatographic development on paper. Ann. Chem. (Rome), *43*, 253-255.

STAHL E., SHROTER G., KRAFT G., RENZ R., 1956 - Dunnschicht-Chromatographie. I - Methode, Einsflusfaktoren und einige Anwendungsbeispiele. Die Pharmazie, II - 633-637.

TISELIUS A., 1941 - Adsorption analysis of amino-acids and peptides. Arkiv. Kemi. Mineral. Geol., 15_B, n° 6.

THOMAS M. C., 1948 - Chromatography : a problem in kinetics, Ann. N-Y. Acad. Sc., *49*, 161.

VELLUZ M., LEGRAND M., 1961 - Zirkulardichroismus und Raumstruktur, Ang. Chem. *73*, 603-611.

WEIL-MALHERBE H., 1943 - Experimental study of chromatography. J. Chem. Soc., 303-310.

WILLIAMS D. H., WILSON J. M., BUDZIEKIEWICZ H., DJERASSI C., 1963 - J. Am. Chem. Soc., *85*, 2 091-2 105.

WILSON J. N., 1940 - A theory of chromatography. J. Am. Chem. Soc., *62*, 1 583-1 591.

WITZ P., HERMANN H., LEHN J-M., OURISSON G., 1963 - Etude des cétones cycliques (XIII). Bull. Soc. Chim. France, 1 101-1 112.

CHAPITRE III

ANALYSE DES STÉROLS DU POLLEN

ANDERSON (1922), SOSA-BOURDOUIL (1954) et MARIELLA (1952) ont déjà isolé des fractions stéroliques, mais jusqu'à ce jour aucune de ces fractions n'a été identifiées.

Il y a quelques années nous avions décrit l'isolement, à partir d'extraits alcooliques de différents pollens, d'un stérol que nous avions identifié comme étant le 24-méthylène cholestérol (1960). BARBIER (1959) avait déjà trouvé ce stérol chez les abeilles et IDLER (1955) chez les huîtres.

Nous rappelons ici, brièvement, les méthodes que nous avons utilisées (nous avons toujours utilisé ce même schéma de purification).

La fraction insaponifiable obtenue à partir d'un extrait alcoolique est chromatographiée sur acide silicique ; les fractions éluées avec un mélange benzène : éther 5 % et ayant une réaction de Liebermann positive sont cristallisées dans le méthanol : on obtient des plaquettes incolores F 141-143°, α_D = - 29 ($CHCl_3$), possédant dans l'infrarouge des bandes intenses à 6,1 et 11,3 μ (caractéristiques des groupements méthyléniques) et n'ayant pas d'absorption caractéristique dans l'ultra-violet.

Les eaux-mères de ce stérol laissent déposer des cristaux F 95°, α_D = + 35 ($CHCl_3$). Ceux-ci ont une réaction de Liebermann positive : l'étude en sera faite au Chapitre VII.

L'acétylation de ce stérol nous donne des cristaux F 134-135°, α_D = - 42 ($CHCl_3$).

L'ozonisation ménagée de l'acétate nous a procuré de l'acétate de 24-céto cholestérol F 124-127° ; celui-ci saponifié fourni du 24-céto cholestérol F 137°, α_D = - 35 ($CHCl_3$).

En fait, le 24-méthylène cholestérol n'est pas seul présent dans cette fraction : la chromatographie en phase gazeuse nous montre qu'il s'agit d'un mélange et la spectrométrie de masse nous a permis de détecter 5 autres stérols en plus du 24-méthylène cholestérol ; celui-ci reste cependant le stérol prédominant.

Nous avons donc repris notre étude depuis le début, nos résultats étant contrôlés par spectrométrie de masse et RMN.

Les 6 stérols mis en évidence par cette étude, possèdent une structure identique dans la partie cyclique du squelette et ne diffèrent que par leur chaîne latérale. Ces chaînes latérales sont les suivantes :

Ces résultats nous ont suggéré une hypothèse de biosynthèse des stérols végétaux par méthylation successive dans la chaîne latérale (voir Chapitre IV).

Ensuite, afin de vérifier si l'on pouvait généraliser, nous avons entrepris l'examen des fractions stéroliques du colza *(Brassica rapa)*, d'une levure *(Rhodotorula mucilaginosa)* et d'une algue *(Nitzschia clostarium)* : cette étude est faite au Chapitre V.

Stérols de pollens :

Trois lots ont été analysés :

- un pollen mixte recueilli sur des trappes à l'entrée des ruches.

- un pollen de châtaignier *(Castanea vulgaris)* obtenu de la même manière ; la pureté botanique de cet échantillon est de 85 %.

- une préparation de stérols de pollen de noisetier *(Coryllus avellana)* que nous devons à l'amabilité de Mr. Sosa.

I - STEROLS DE POLLEN MIXTE

L'analyse des stérols de pollen mixte a permis la mise au point des méthodes analytiques utilisées par la suite.

Les extraits alcooliques obtenus à partir d'un pollen mixte ont été saponifiés et la fraction insaponifiable chromatographiée sur colonne d'acide silicique ; les fractions éluées par le mélange benzène-éther 95 : 5 et donnant une coloration verte avec le réactif de Liebermann ont été réunies et chromatographiées une seconde fois. Après cristallisation dans le méthanol des fractions ayant une réaction de Liebermann positive, on obtient des cristaux incolores F 140-143° (plaques), α_D = - 39 ($CHCl_3$). Les eaux-mères de cristallisation ont été réunies et cristallisées à nouveau : on a obtenu des cristaux F 92-95°, α_D = + 35 ($CHCl_3$) (voir Chapitre VII).

Le spectre ultra-violet de cette fraction ne montre aucune absorption entre 200 et 360 mμ ; ceci écarte la présence de stérols possédant un système conjugué.

Le spectre de RMN dans CCl_4 présente des analogies avec le spectre du cholestérol (purifié par le dibromure) mesuré dans les mêmes conditions, ainsi qu'avec le spectre du 24-méthylène cholestérol préparé par réaction du triphénylphosphine méthylène (phényl lithien du bromobenzène sur le bromure de phényl méthyl phosphonium) sur l'acétate de 24-céto cholestérol selon la technique préconisée par IDLER (1957).

On relève dans ces spectres les caractères communs suivants : signal de C-CH_3 à δ = 0,67 ppm et à δ = 1,00 ppm que l'on peut attribuer aux deux méthyles en 18 et 19 ; multiplet du proton éthylénique à δ = 5,26 ppm. Ces résultats suggèrent que les cycles A, B, C et D ont une structure identique dans le cholestérol, le 24-méthylène cholestérol et dans les stérols de la fraction 142-143°.

La présence du groupe méthylénique dans la fraction F 142-143° est confirmée par deux signaux caractéristiques à δ = 5,60 ppm. Mais la courbe d'intégration indique que la substance est un mélange avec d'autres composés ne possédant pas le groupe méthylénique. En effet, le rapport de l'intensité des pics correspondant à ce groupe à l'intensité du multiplet du proton éthylénique résonnant à δ = 5,26 ppm est de 0,60 environ, alors qu'il devrait théoriquement être de 2, si la substance était uniquement constituée de composés contenant tous un groupe méthylénique. L'examen du spectre RMN ne permet pas de connaître la nature des autres constituants.

Les résultats ci-dessus sont confirmés par la spectrométrie de masse, qui permet, en outre d'obtenir quelques précisions sur le poids moléculaire des stérols accompagnant le 24-méthylène cholestérol et sur la structure de leur chaîne latérale (MAYO DE P. 1956).

Le spectre de masse de la fraction stérolique F 142-143° montre la présence d'un mélange de stérols homologues possédant différents degrés de saturation.

Afin de déterminer la composition de ce mélange, nous avons préparé des dérivés qui ont facilité l'étude par spectrométrie de masse.

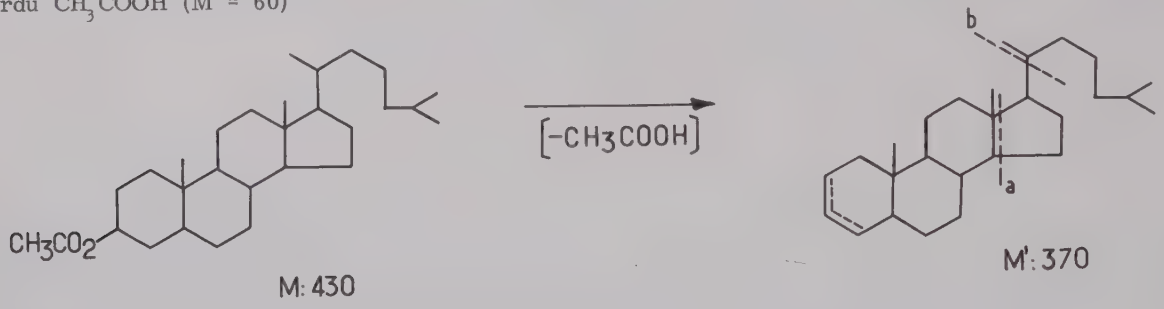
- le spectre de masse de l'acétate hydrogéné (F 135°) montre un groupe de pics à : m/e 370 ($C_{27}H_{46}$), m/e 384 ($C_{28}H_{48}$) et m/e 398 ($C_{29}H_{50}$). Ces trois pics peuvent être interprétés comme provenant de trois acétates homologues $C_{29}H_{50}O_2$, $C_{30}H_{52}O_2$ et $C_{31}H_{54}O_2$, formés avec perte d'acide acétique (60) à partir des ions moléculaires ; les pics de masse moléculaire sont absents.

Calculée à partir des pics à M-60 fournis par les acétates hydrogénés, la composition de ce mélange est approximativement la suivante :

- stérols en C_{27} : 15 %,
- stérols en C_{28} : 50 %,
- stérols en C_{29} : 35 %.

Le spectre de masse de stéroïdes dont la chaîne latérale est comparable à celle du cholestérol et dont les seuls groupes fonctionnels sont, soit un hydroxyle, soit un dérivé de cette fonction, soit une double liaison dans le cycle A, montre dans tous les cas, 2 pics caractéristiques dans la région des masses moléculaires élevées : l'un dû au clivage a avec perte d'un hydrogène, l'autre obtenu selon le clivage b, la charge restant sur le fragment à gauche de la ligne de coupure.

Avec les stérols acétylés, ces ruptures ont lieu principalement dans les fragments ayant déjà perdu CH_3COOH (M = 60)



Donc, l'acétate de cholestanyle (M = 430) montre un pic correspondant au clivage a à m/e = 215 (M' - 155) et un autre dû au clivage b, à m/e = 257 (M' - 113).

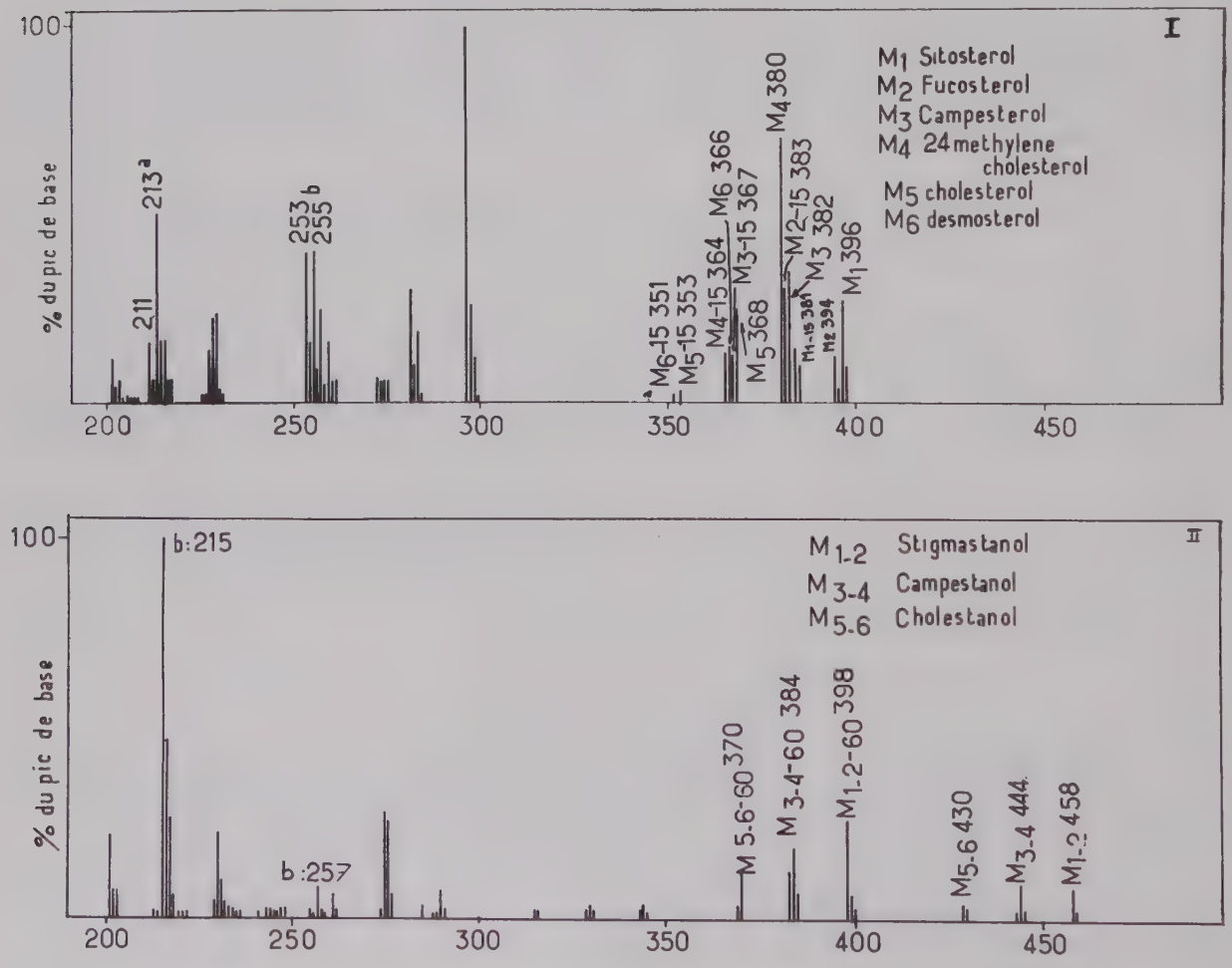


Fig. 2 - Spectres de masse de la fraction 142-143° :
I - acétate ; II - acétate hydrogéné.

Le pic dû au clivage b est parfois petit (5 % du pic de base pour l'acétate de 3-hydroxy lanostane par exemple) ; mais puisqu'il se rencontre dans une région du spectre où seulement quelques autres pics sont présents, il peut être considéré comme caractéristique.

L'homologue supérieur (M = 444) ayant un CH_2 supplémentaire dans la chaîne latérale montrera les mêmes pics, alors que l'homologue isomère ayant le CH_2 supplémentaire quelque part dans les cycles A, B ou C donnerait 2 pics à m/e = 229 et m/e = 271 (augmentés chacun de 14).

De cette façon il paraît possible de décider de la localisation des carbones supplémentaires dans les trois régions déterminées par les lignes de coupure. Cependant, il n'est pas possible, par cette méthode, de situer les groupes CH_2 à l'intérieur de ces régions.

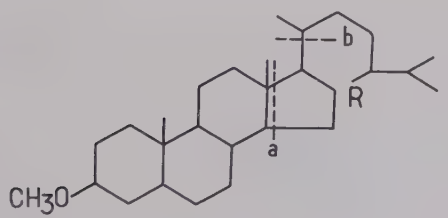
Des masses attendues pour ces homologues et produites par le clivage a (215, 229 et 243), seule celle à 215 est présente. La même remarque est valable pour les pics attendus du clivage b : des possibilités m/e 257, 271 et 285, on observe seulement la valeur inférieure, 257. Ces deux pics (215 et 257) sont identiques à ceux donnés par le cholestène-2, ce qui montre que les carbones additionnels des homologues supérieurs sont situés à la droite de la ligne de clivage a et aussi à la droite de la ligne de clivage b. Cependant il n'est pas possible de déduire leur position sur la chaîne latérale.

- le spectre de masse de l'acétate (F 133-135°, α_D = - 40 ($CHCl_3$)) confirme les résultats précédents. Il montre de plus que chacun des trois homologues existe sous deux degrés d'insaturation. Se fondant encore sur l'argument des pics à M-60, en absence de l'ion moléculaire de masse M, on trouve : m/e 368 ($C_{27}H_{44}$), 382 ($C_{28}H_{46}$), 396 ($C_{29}H_{48}$), 366 ($C_{27}H_{42}$), 380 ($C_{28}H_{44}$) et 394 ($C_{29}H_{46}$), correspondant aux acétates suivants : $C_{29}H_{46}O_2$, $C_{29}H_{48}O_2$, $C_{30}H_{48}O_2$, $C_{30}H_{50}O_2$, $C_{31}H_{50}O_2$ et $C_{31}H_{52}O_2$.

L'acétate correspondant au 24-méthylène cholestérol (pic M-60 à m/e 380) est le principal composant de ce mélange.

- spectres de masse des éthers méthyliques des stérols hydrogénés : nous avons fait les éthers méthyliques de ces stérols après hydrogénation (action du tertio butoxide de potassium puis de l'iodure de méthyle) et nous avons pu recueillir, après injection dans un chromatographe en phase gazeuse, en suivant la technique préconisée par CLAYTON (1962), trois fractions :

- 1ère fraction : F 78-80°, elle correspond à l'éther méthylique du cholestanol
  M_1 = 402, pic m/e = 387 (départ d'un méthyle,
  m/e = 215 et 257 (coupures a et b).
- 2ème fraction : F 90-91°, elle correspond à l'éther méthylique du campestanol,
  M_2 = 416, pic à m/e = 401 (départ d'un méthyle),
  m/e = 215 et 257 (coupures a et b).
- 3ème fraction : F 99-101°, elle correspond à l'éther méthylique du stigmastanol,
  M = 430, pic à m/e = 415 (départ d'un méthyle),
  m/e = 215 et 257 (coupures a et b).



R=H M_1= 402
CH_3 M_2=416
CH_2CH_3 M_3=430

Ces fractions recueillies sont pures (elles ne contiennent pas plus de 1 à 5 % des homologues inférieurs ou supérieurs). Le mélange était composé à peu près de la manière suivante : stérol C_{27} : 10 %, stérol C_{28} : 50 %, stérol C_{29} : 40 % ; ce qui est en excellent accord avec la spectrométrie de masse.

En conclusion, la spectrométrie de masse montre que la fraction stérolique F 142-143° contient un mélange de stérols en C_{27}, C_{28} et C_{29} ; dans chacune de ces séries il existe des représentants ayant une double liaison (probablement dans le cycle B) et deux doubles liaisons (dont l'une serait dans le cycle B et l'autre dans la chaîne latérale).

En vue de compléter les données des mesures physiques, nous avons effectué une ozonisation (IDLER 1955) et une oxydation selon Oppenauer (MEYSTRE 1946) :

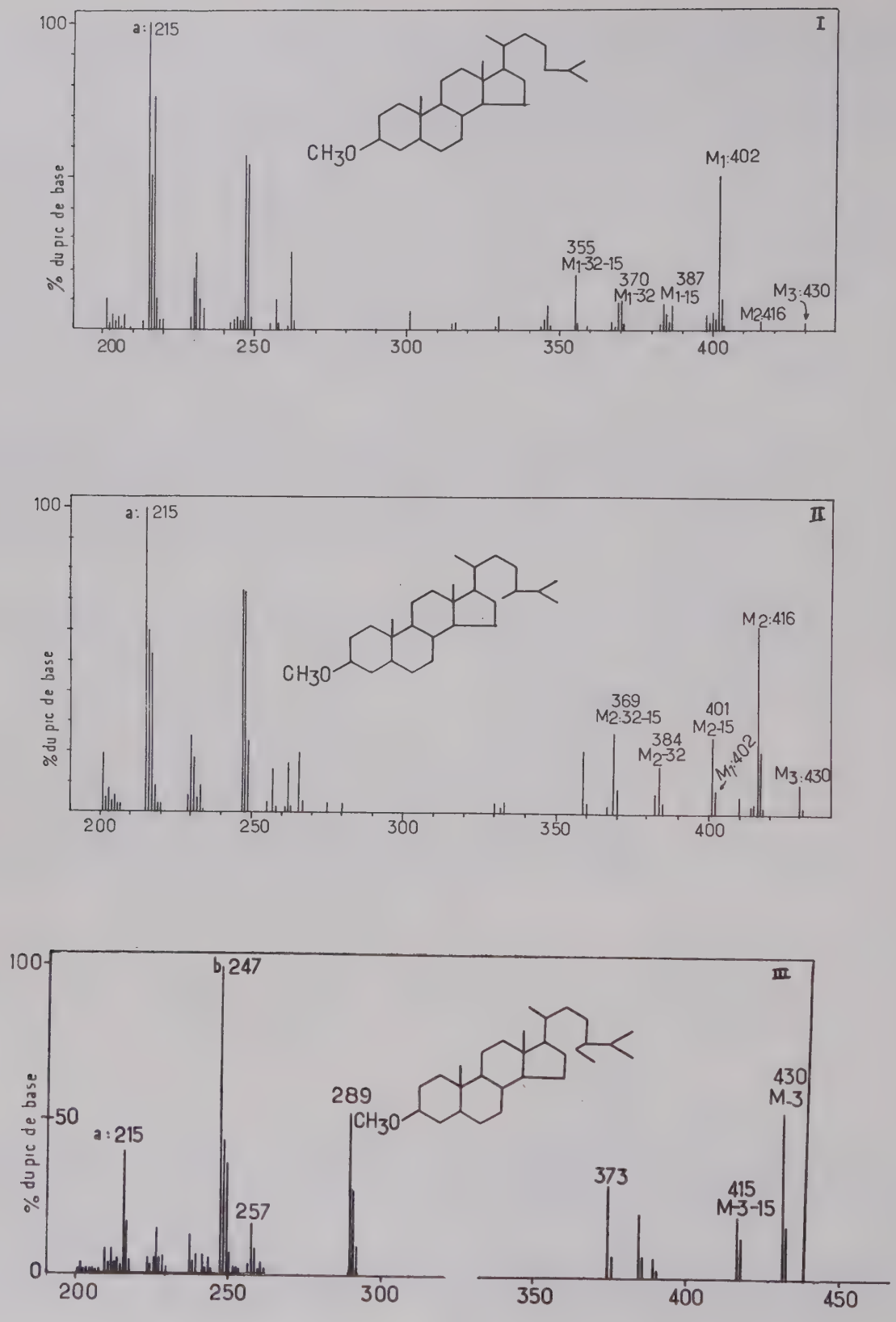
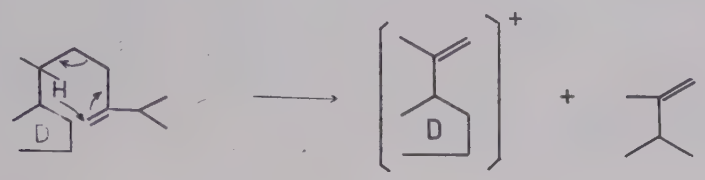


Fig. 3 - Spectres de masse des éthers méthyliques :
I - éther méthylique du cholestanol ; II - éther méthylique du campestanol ; III - éther méthylique du stigmastanol.

- ozonisation : l'acétate du mélange de stérols a été soumis à l'ozonisation ; la partie neutre ainsi obtenue après chromatographie sur acide silicique a donné l'acétate de 24-céto cholestérol F 127°, α_D = - 42 ($CHCl_3$).

Le spectre de masse de cet acétate est rigoureusement identique à celui d'un acétate de 24-céto cholestérol authentique que nous avons préparé par condensation de l'organocadmien du bromure d'isopropyle sur le chlorure de l'acide cholénique préalablement acétylé (RIEGEL 1944). De plus le spectre présente un très grand pic à m/e = 296. Ce pic est le même que celui que l'on trouve dans le fucostérol, où il est pic de base, et dans le 24 céto cholestérol : il provient sans doute d'un mécanisme cyclique du type :



Il est unique (pas de pic à + 2 ou + 14) ce qui prouve que pour des composés possédant une double liaison en 24 le squelette est rigoureusement le même dans la partie cyclique.

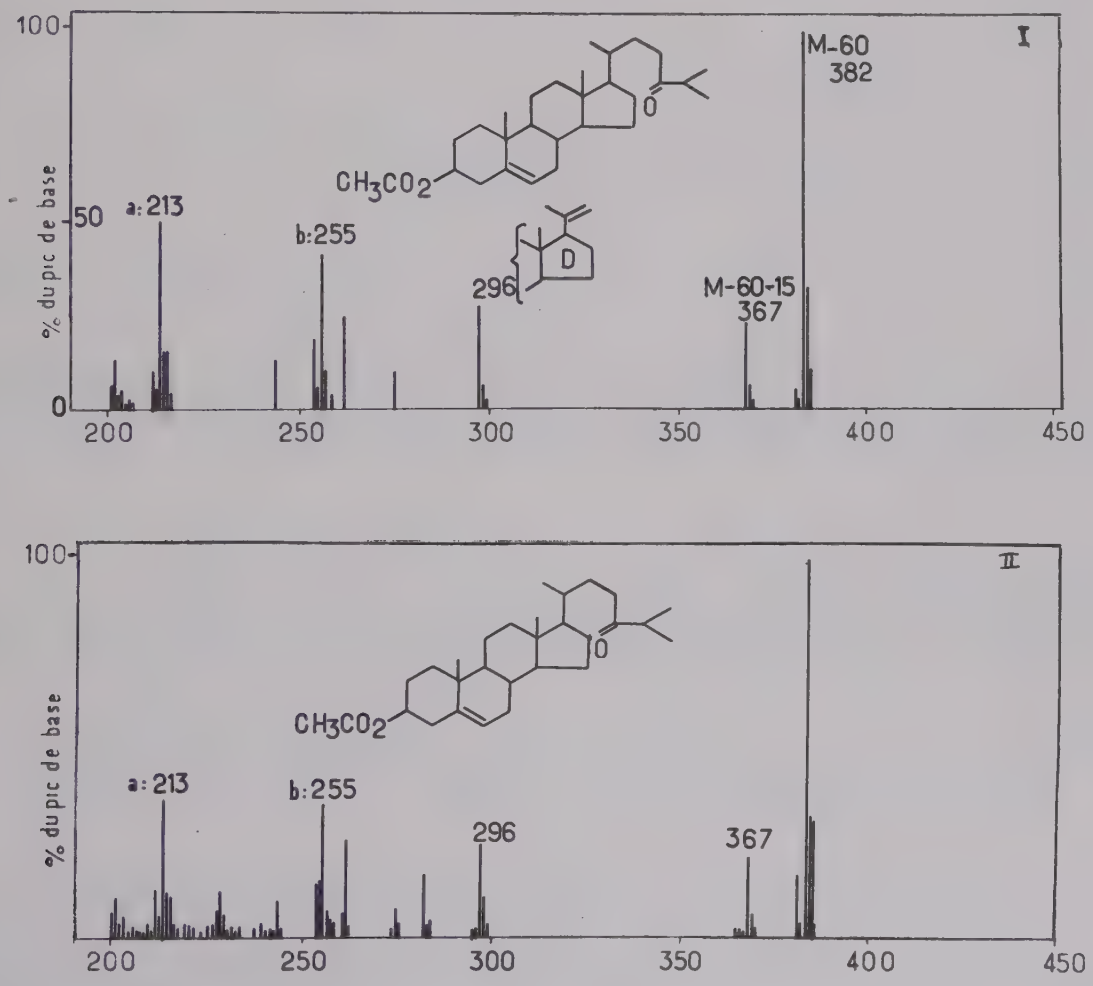


Fig. 4 - Spectres de masse de l'acétate de 24-céto cholestérol :
I - de synthèse ; II - d'ozonolyse.

ANDERSEN (1957) et KHAN (1961) ont déjà trouvé le fucostérol dans les plantes supérieures.

La facile obtention de 24-céto cholestérol, par ozonolyse du mélange de stérols, confirme la présence du 24-méthylène cholestérol et éventuellement du fucostérol et rend peu probable la présence de l'isomère du fucostérol portant en 24 un substituant vinyle.

La fraction volatile est entraînée à la vapeur d'eau et recueillie dans une solution de chlorydrate de 2,4 dinitrophénylhydrazine. Le précipité ainsi obtenu donne à la chromatographie circulaire sur papier (décaline-diméthylformamide) deux taches ayant le R_f des dérivés du formaldehyde et de l'acétaldehyde (HORNER 1955). L'identification de l'acétaldehyde parmi les produits d'ozonisation indique la présence de stérols ayant le groupement R - CH = CH - CH_3 (par exemple le fucostérol).

- oxydation selon Oppenauer : la cétone insaturée ainsi obtenue avec un bon rendement F 75-82°, avait une absorption ultraviolette typique d'un 3-céto stéroïde insaturé en 4,5 (λ_{max} = 240 mμ, ε = 15000). Ceci prouve que la plus grande partie du mélange de stérols est composée de 3-hydroxy stérols insaturés en 5,6, confirmant ainsi les conclusions tirées du spectre RMN.

II - STEROLS DE POLLEN DE CHATAIGNIER

La même méthode d'extraction et de purification décrite ci-dessus, appliquée au pollen de châtaigner, donne un mélange F 138-139°, α_D = - 42 ($CHCl_3$), acétate F 125-127°, acétate hydrogéné F 130-132°. Le spectre Ultraviolet montre l'absence de diène conjugué.

Le spectre RMN indique, comme précédemment, qu'il s'agit d'un mélange de stérols dont la plus grande partie aurait la structure cyclique du cholestérol et ne diffèrerait que par la structure de la chaîne latérale.

La composition du mélange, calculée à partir des pics à M-60 dans le spectre de masse des stérols acétylés et hydrogénés, enregistré à basse tension, est à peu près la suivante : stérols en C_{27} : 3 % ; stérols en C_{28} : 23 % ; stérols en C_{29} : 74 %.

Le spectre de masse des acétates montre que le 24-méthylène cholestérol (pic à m/e = 380) est présent en faible proportion dans ce pollen et que le principal composant est un stérol possédant un méthyle dans la chaîne latérale, par exemple l'ergostanol-5 (pic à m/e = 382) et un éthyle dans la chaîne latérale, par exemple le sitostérol (pic à m/e = 396).

Afin de vérifier si la composition originale en stérols n'avait pas été modifiée au cours des diverses purifications, la même série de mesures spectrométriques a été répétée sur un insaponifiable brut. Les résultats sont pratiquement les mêmes que ceux obtenus sur les fractions purifiées. Les procédés de purification modifient peu les pourcentages relatifs des divers stérols.

Les seules différences à remarquer sont, d'une part, la présence d'un pic d'intensité moyenne à m/e = 366, correspondant au fragment M-60 d'un acétate de stérol en C_{27} ayant apparemment une double liaison dans la chaîne latérale, par exemple le desmostérol, et d'autre part, la présence de petits pics autour de la masse 410 dus peut-être à des acétates de dérivés du lanostane, à différents degrés d'insaturation.

III - STEROLS DU POLLEN DE NOISETIER*

SOSA-BOURDOUIL (1954) a déjà décrit une préparation stérolique de pollen de noisetier. Ce stérol a été isolé par chromatographie de l'insaponifiable sur colonne d'alumine, puis cristallisé dans le méthanol, F 138-5°, α_D = - 25,3 ($CHCl_3$).

Le spectre de masse de l'acétate montre une série de pics due aux masses M-60 d'acétates de stérols :

- en C_{28} avec une double liaison,
- en C_{29} avec une et deux doubles liaisons.

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus pour le pollen du châtaignier, sauf qu'aucun pic dû à des stérols en C_{27} ne peut être observé.

---

* Nous remercions vivement M. et Mme Sosa d'avoir mis leur préparation à notre disposition. Il s'agit du stérol I de ces auteurs. Nous n'avons pas examiné le stérol II qui n'était plus disponible.

Le spectre de l'acétate hydrogéné indique que les carbones supplémentaires (par rapport au cholestérol) sont situés dans la chaîne latérale.

PARTIE EXPERIMENTALE

POLLEN MIXTE

L'extrait alcoolique, obtenu par épuisement du pollen à température ordinaire est de 30 % en poids.

a) Saponification, obtention des stérols :

140 g d'extrait sont mis à reflux avec 300 cm^3 de potasse méthanolique (2N). Après extraction nous avons 13 g d'insaponifiable qui sont filtrés sur une colonne d'acide silicique de 700 g ; les élutions sont de 500 cm^3.

1	Benzène	0
2	"	1,540
3	"	1,06
4	Benzène-éther 95:5	0,607
5	"	0,416
6-7	"	4,325
8	"	1,006
9	"	0,375
10	Benzène-éther 9:1	0,467
11	Benzène-éther 1:1	1,071
12-14	Ether	1,285
15	"	0,294
16-17	Ether-méthanol 4:1	0,377

Les fractions 6-7-8 ont une réaction de Liebermann positive. Par cristallisation dans le méthanol on obtient des plaquettes incolores F 142-143°, α_D = - 39 ($CHCl_3$), en tout 629 mg. (Les eaux-mères laissent déposer des cristaux F 95°, α_D = + 35 ($CHCl_3$), l'étude en sera faite au chapitre VII).

b) Acétylation et dérivés de l'acétate :

200 mg sont dissous dans 10 cm^3 de pyridine, on y ajoute 8 cm^3 d'anhydride acétique et on laisse à l'étuve une nuit à 37°. Après extraction à l'éther, lavage de la phase éthérée par CO_3Na_2 (5 %), l'eau, puis HCl (2N) et enfin avec de l'eau on obtient, après cristallisation dans le méthanol 180 mg de cristaux F 133-135°, α_D = - 40 ($CHCl_3$).

A partir de cet acétate nous avons fabriqué plusieurs dérivés :

- acétate hydrogéné :

10 mg d'acétate sont dissous dans 2 cm^3 d'acide acétique on y ajoute 12 mg de PtO_2 (Adams) et l'on abandonne sous hydrogène avec agitation durant 2 heures. La solution est filtrée, amenée à sec, reprise par l'éther et lavée au carbonate et à l'eau. Le produit est cristallisé dans le méthanol, F 135°.

- acétate de 24-céto cholestérol :

Il a été obtenu par ozonolyse ménagée : 10 moles d'ozone par mole de substance. On dissous 100 mg d'acétate dans 20 cm^3 d'acide acétique et l'on arrête la réaction quand 90 % de la quantité théorique d'ozone a circulé. Après avoir ajouté 60 cm^3 d'eau on fait bouillir 5 minutes de façon à détruire l'ozonide ; on extrait par 20 cm^3 de chloroforme et lave avec du carbonate ; on obtient 100 mg d'une substance que l'on chromatographie sur 8 g d'acide silicique ; les élutions sont de 25 cm^3:

1	Benzène	62 mg	F 125-131°
2	"	10	F 135-134°
3	Benzène-chloroforme 49:1	0	
4	"	10	
5	"	traces	
7	Benzène-chloroforme 95:5	15	
8	"	traces	
9-10	Chloroforme	traces	

Les fractions 6-7 cristallisées dans le méthanol donnent 6 mg de plaquettes incolores F 124-127°, α_D = - 40 ($CHCl_3$) ; le spectre de masse montre que le produit obtenu est rigoureusement pur. Les fractions du début sont de l'acétate n'ayant pas réagi.

- ozonisation totale :

Elle a été effectuée sur 40 mg d'acétate, dissous dans 10 cm^3 d'acide acétique ; on laisse 40 minutes à ozoniser. On entraîne ensuite les aldéhydes formés dans 10 cm^3 d'une solution de 2,4 dinitrophénylhydrazine à 50 mg/10 cm^3 HCl (4N). Le précipité est centrifugé. Nous avons fait une chromatographie circulaire sur papier Whatmann n° 1 imprégné de diméthylformamide, en développant par la décaline : nous avons observé 2 taches de R_f 0,24 et 0,4 ; ces valeurs correspondent à celles que l'on a avec des échantillons authentiques des 2,4 dinitrophénylhydrazones de la formaldéhyde et de l'acétaldéhyde.

- réaction d'Oppenauer :

10 mg sont dissous dans 10 cm^3 de toluène anhydre, on y ajoute 1 cm^3 de cyclohexanone distillée ; on porte à reflux et l'on fait tomber dans le mélange 50 mg d'isopropylate d'aluminium en suspension dans 5 cm^3 de toluène, durant trente minutes. Quand la solution est froide on lave au sel de Seignette et l'on entraîne à la vapeur : il reste une huile que l'on distille dans un tube à boules : la fraction ne distillant pas à 130° (8 mg) est cristallisée dans un mélange éther-pentane elle donne 6 mg de cristaux F 75-82°.

Le produit brut et le produit cristallisé absorbent dans l'ultra-violet à 240 mμ (spectres faits dans l'éthanol), maximum des 3-céto Δ_4 stéroïdes, et leur ε est respectivement de 15 000 et 17 000.

d) Préparation des éthers méthyliques :

- acétylation :

On acétyle 25 mg du mélange de stérols, de la manière habituelle.

- hydrogénation totale :

On dissous l'acétate dans 2 cm^3 d'acide acétique, on y ajoute 25 mg de PtO_2 et on laisse sous hydrogène 1 heure, on filtre et évapore à sec.

- saponification

Le produit obtenu est mis à reflux 2 heures avec 2 cm^3 de potasse méthanolique (2N) ; on extrait par l'éther et lave à l'eau.

- méthylation :

On prépare du tertio butoxide de potassium (500 mg de potassium 5 cm^3 d'alcool butylique tertiaire) ; quand la réaction est terminée on ajoute l'insaponifiable dissous dans 1 cm^3 d'éther, on laisse un quart d'heure en contact ; on verse alors 2 cm^3 d'iodure de méthyle et 4 cm^3 d'alcool butylique tertiaire ; on abandonne ensuite 4 heures à température ordinaire. Toutes les étapes de la réaction se font sous azote.

On extrait par l'éther et lave à l'eau ; on filtre la phase éthérée sur alumine d'activité 1 : les éthers méthyliques sont élués par l'éther de pétrole (15 mg).

- séparation des éthers par chromatographie en phase gazeuse :

Nous avons pu recueillir 3 fractions principales dans les conditions suivantes : nous avons utilisé une colonne remplie de Chromosorb W (acide) contenant 5 % de diéthylène glycol succinate

(longueur 1,85 m, diamètre 4 mm). La température d'entrée était de 320°, celle de sortie 240° et celle du four 200°. Nous avions un débit d'hélium de 120 cm³/minute et la vitesse d'enregistrement était de 0,125 mm/seconde.

Les trois fractions ont été cristallisées dans le méthanol ; en spectrométrie de masse elles se sont révélées être pures à 95-99 % :

- la première correspond à l'éther méthylique du cholestanol : temps de rétention 19 minutes, F 78-80°.

- la deuxième à l'éther méthylique du campestanol : temps de rétention 26 minutes, F 90-91°.

- la troisième à l'éther méthylique du stigmastanol : temps de rétention 32 minutes, F 99-101°.

POLLEN DE CHATAIGNIER :

L'extrait alcoolique a été fait sur 500 g de pollen broyé (pureté 85 %).

- Saponification, obtention des stérols :

100 g de cet extrait ont été saponifiés par 150 cm³ de potasse méthanolique (2N) (3 heures à reflux). Nous avons obtenu 14 g d'insaponifiable qui ont été filtrés sur 100 g d'acide silicique :

1-2	200 cm³	Ether de pétrole-benzène 1:1	0
3	100	Benzène	0,044
4	"	"	0,636
5	"	"	0,206
6	"	"	0,046
7	"	Benzène-éther 95:5	0,030
8	"	"	0,357
9	"	"	0,241
10	"	"	0,042
11	"	Benzène-éther 9:1	traces
12	"	Benzène-éther 4:1	0,052
13	"	Benzène-éther 1:1	traces
14	400	Ether	0
15	"	Ether-méthanol 4:1	0

Les fractions 8-9-10, ayant un Liebermann positif sont cristallisées dans le méthanol, F 138-139°, α_D = - 42 ($CHCl_3$). Différentes en cela de celles du pollen mixte, les eaux mères nous ont toujours donné des stérols ayant des points de fusion élevés et des pouvoirs rotatoires négatifs.

- Acétylation et dérivé de l'acétate :

L'acétylation a été faite sur 20 mg dans 1 cm³ de pyridine et 0,8 cm³ d'anhydride acétique ; les cristaux obtenus fondent entre 125 et 127°.

- hydrogénation partielle :

Nous avons hydrogéné 10 mg de cet acétate dans 5 cm³ d'éther en présence de 8 mg de PtO_2 : nous avons obtenu un produit conservant sa double liaison dans le cycle B et hydrogéné dans la chaîne (étude faite au spectre de masse ; les bandes méthyléniques ont disparu à l'infra-rouge).

Synthèse du 24-céto cholestérol :

- acétylation de l'acide cholénique :

1 g d'acide est dissous dans 7 cm³ de pyridine et 6,8 cm³ d'anhydride acétique et abandonné

une nuit à 37°. Après extraction et cristallisation dans le chloroforme on obtient 600 mg d'acétate fondant entre 183 et 185°.

- synthèse :

Le chlorure de l'acétoxy-acide (obtenu par action du chlorure de thionyle, 4 cm³, et ébullition durant 20 minutes) n'est pas isolé mais dissous dans le benzène et ajouté à une solution de di-isopropylcadmium obtenu de la manière suivante : à 360 mg de magnésium en suspension dans 50 cm³ d'éther on ajoute 3 g de bromure d'isopropyle dissous dans 5 cm³ d'éther ; quand la réaction est complète on ajoute 1,4 g de chlorure de cadmium ; on laisse 20 minutes en contact avant d'ajouter le chlorure d'acide. Quand ceci est terminé on laisse la réaction à température ordinaire durant 18 heures. On extrait alors par l'éther (20 cm³) on lave par HCl (2N) (10 cm³) et par de l'eau (20 cm³).

-saponification et purification :

On dissout le produit obtenu dans 2 cm³ de benzène et on laisse une heure à reflux avec 20 cm³ de potasse méthanolique (2N) ; après extraction par l'éther on obtient 230 mg de sirop brun que l'on chromatographie sur 14 g d'acide silicique, les élutions sont de 10 cm³ :

1-2	Ether de pétrole-benzène 1:1	0
3-4	Benzène	traces
5-6	Benzène-éther 9:1	traces
7	Benzène-éther 4:1	120
8	"	75
9	"	traces
10-11	Benzène-éther 1:1	0
12-14	Ether	0

après cristallisation dans le méthanol les cristaux fondent entre 134 et 136°, α_D = - 35 ($CHCl_3$).

- acétylation :

En procédant de la manière habituelle (10 mg une nuit à 37° en présence de 1 cm³ de pyridine et 0,8 cm³ d'anhydride acétique) nous obtenons après cristallisation dans le méthanol des plaquettes incolores F 126-128°, α_D = - 40° ($CHCl_3$).

Cet acétate nous a servi comme produit de référence en spectrométrie de masse et en RMN. Il nous a servi de point de départ pour la synthèse du 24-méthylène cholestérol.

Synthèse du 24-méthylène cholestérol :

- préparation du phényl-lithien et condensation sur le bromure de triphénylméthyl phosphonium :

On fait réagir 15,7 g de bromobenzène sur 1,4 g de lithium dans 50 cm³ d'éther anhydre, on obtient une solution brune. On prend 10 cm³ de cette solution (quantité théorique 7,5 cm³) à laquelle on ajoute 2,4 g de bromure de triphénylméthylphosphonium dans 20 cm³ d'éther. On laisse 3 heures en contact avec agitation.

- condensation et purification :

A 20 cm³ du réactif on ajoute 225 mg d'acétate de 24-céto cholestérol, on laisse 1 heure à température ordinaire et 4 heures à 65° en agitant. On reprend ensuite par de l'éther (50 cm³) et de l'eau (50 cm³), on lave la phase éthérée par de l'eau acidulée (20 cm³) puis par de l'eau (50 cm³) : on obtient un sirop brun que l'on acétyle directement (2 cm³ de pyridine et 1,8 cm³ d'anhydride acétique, une nuit à 37°) avant de le chromatographier sur 40 g d'acide silicique ; nous avions 600 mg de produit et les élutions étaient de 75 cm³ :

1	Ether de pétrole-benzène 1:1	90
2	"	100
3	"	89
4	"	8
5	"	6

6	Benzène	46
7	"	0
8	Benzène-éther 1:1	0
9	Ether	0

Après avoir cristallisé les fractions 1-5 nous avons obtenu 20 mg de produit F 132-134,5°, α_D = - 39 ($CHCl_3$) ; cet acétate présente les bandes méthyléniques à 6,1 et 11,3 μ dans son spectre infra-rouge : il nous a servi de témoin pour les spectrométries de masse et de RMN. Les eaux-mères contiennent de l'acétate de 24-céto cholestérol n'ayant pas réagi.

BIBLIOGRAPHIE

ANDERSEN B., KRAWACK B., 1957 - The sterols of coconut oil, Acta Chem. Scand. *11*, 997-1002.

ANDERSON R.J. (1923) - Composition of corn pollen. J. Biol. Chem., *55*, 611-628.

BARBIER M., HUGEL M-F., LEDERER E., 1960 - Isolement du 24-méthylène cholestérol à partir du pollen de différentes plantes. Bull. Soc. Chim. Biol., *42*, 91-97.

BARBIER M., SCHINDLER O., 1959 - Isolierung von 42-Methylencholesterin aus Königinnen und Arbeiterinnen der Honigbiene *(Apis mellifica L.)*, Helv. Chem. Acta, *42*, 1999-2005.

CLAYTON R.B., 1962 - Gas liquid chromatography of sterol methyl ethers and some correlations between molecular structure and retention data. Biochem., 357-366.

FAGERLUND U.H.M., IDLER D.R., 1956 - Marine sterols II, J. Chem. Soc., *21*, 372.

HORNE L., KIRMSE W., 1955 - Course of substitutions IX, Ann. *599* ; 48-65.

IDLER D.R., FAGERLUND U.H.M., 1957 - The synthesis of 24-methylene cholesterol and 25-dehydrocholesterol, J. Am. Chem. Soc., *79*, 1988-1991.

IDLER D.R., FAGERLUND U.H.M., 1955 - Isolation of 24-methylencholesterol from molluscs. J. Am. Chem. Soc., *77*, 4142-4144.

KHAN S.A., QURESHI M.I., BHATTY M.K., KORIMLLAH, 1961 - Composition of the oil of *Asphodelus fistulosis* seeds, J. Am. Oil Chemist Soc., *38*, 452-453.

MARIELLA R.P., BERNSTEIN T.B., MOSHER A.L., 1952 - Purification of ragweed pollen. Bol. Quim. Porto-Rico, *9*, 15-24.

MAYO P. DE, REED R.I., 1962 - The application of the mass spectrometery to steroids and terpenoids. Chem. Ind., 1481-1482.

MEYSTRE C., FREY H., NEHER R., WETTSTEIN A., MIESCHER K., 1946 - Uber Steroide. Ein einfacher Abbau der Gallensäuren-seintenkette V., Helv. Chem. Acta, *29*, 627-634.

RIEGEL B., KAYE I.A., 1944 - The preparation of 24-Keto and 24-hydroxycholesterol and certain derivatives, J. Am. Chem. Soc., *66*, 723-724.

SOSA-BOURDOUIL C., SOSA A., 1954 - Recherches sur la composition du pollen de *Coryllus avellana L.*. Bull. Soc. Chim. Biol., *36*, 393-404.

CHAPITRE IV

HYPOTHÈSE DE BIOSYNTHÈSE DES STÉROLS VÉGÉTAUX

Les résultats obtenus au cours de l'analyse des stérols de divers pollens nous ont amenés à proposer une hypothèse de biosynthèse. Afin de constater si cette hypothèse pouvait être étendue à la biosynthèse de phytostérols en général, nous avons entrepris l'étude de la composition d'insaponifiables d'origines diverses (Chapitre V).

Biosynthèse des stérols du pollen :

Malgré les proportions très variables de divers stérols trouvés dans les échantillons de pollen examinés, nous pensons pouvoir proposer une filiation biogénétique de ces substances.

Le résultat essentiel de notre travail semble être la mise en évidence simultanée de stérols en C_{27}, C_{28}, C_{29}.

Le stérol mono-insaturé en C_{27} présent dans le pollen est sans doute le cholestérol. Le cholestérol a été trouvé par TSUDA (1957 et 1958) dans les algues rouges et tout récemment par JOHNSON, BENNET et HEFTMANN (1963) dans des plantes supérieures : *Solanum tuberosum* et *Dioscorea spiculiflora*. Le stérol monoinsaturé en C_{28} pourrait être le 24-méthyl cholestérol (III). Le stérol monoinsaturé en C_{29} est probablement le sistostérol (V).

D'après ce que l'on sait de la biosynthèse des stérols en général, le stérol doublement insaturé en C_{27} serait le desmostérol (I) (STOKES 1958), le principal dérivé doublement insaturé en C_{28} est certainement le 24-méthylène cholestérol (II), quand à l'homologue en C_{29} il pourrait être le fucostérol (IV).

Il est connu que dans la levure, l'ergosterol est synthétisé à partir d'un précurseur (lanostérol ou desmostérol ?) par une C-méthylation en C_{24}, grâce à l'intervention de la méthionine (ALEXANDER et SCHWENK 1957).

On peut envisager la biosynthèse des phytostérols en C_{29} par une nouvelle C-méthylation d'un stérol en C_{28} (du 24-méthylène cholestérol (II) en particulier) en accord avec des hypothèses proposées récemment par A. J. Birch et par D. Arigoni (Discussion au Corso Estivo di Chimica, Milan, Septembre 1962).

On aurait ainsi la série biosynthétique suivante :

lanostérol ⟶ desmostérol ⟶ 24 méthylène cholestérol ⟶ fucostérol ⟶ sitostérol.

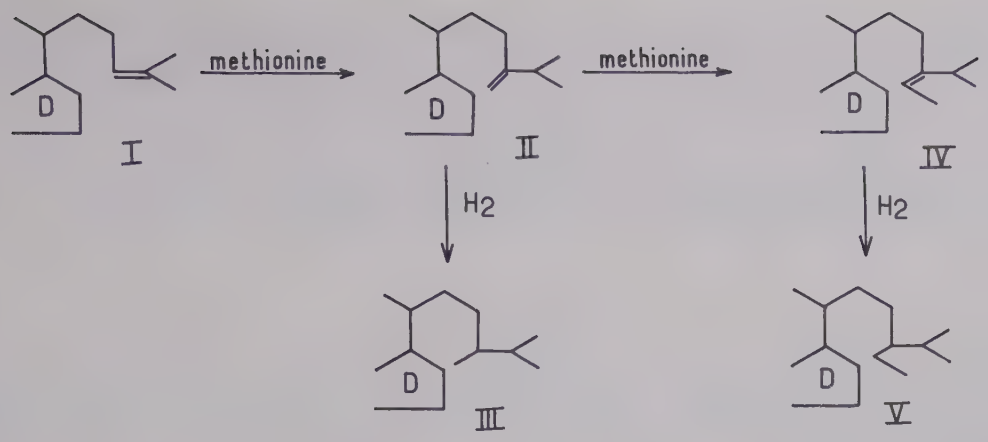
C_{30} | lanostérol

C_{27} | desmostérol (I) ⟶ cholestérol

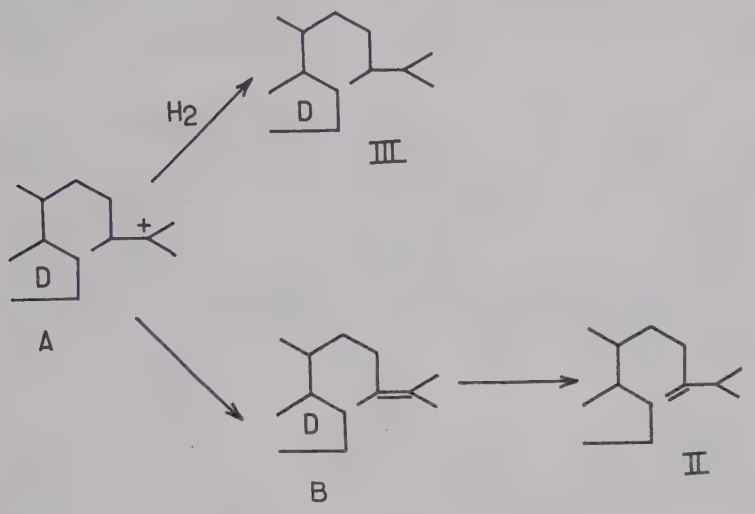
C_{28} | 24-méthylène cholestérol (II) ⟶ 24-méthyl cholestérol (III)

C_{29} ↓ fucostérol (IV) ⟶ sitostérol (V)

La formation du 24 méthylène cholestérol (II) à partir du desmostérol (I) procède certainement par plusieurs étapes ; on admet en général que la première étape de la méthylation de (I) par la méthionine serait un cation (A) qui se stabiliserait soit en (B), soit par réduction en (III).

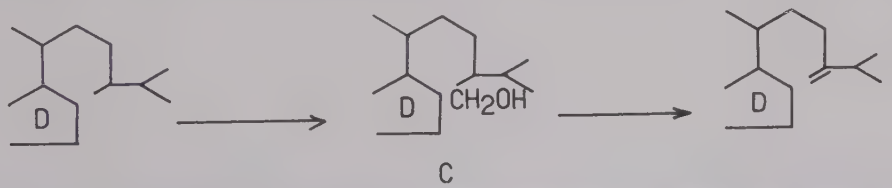


Une migration de la double liaison de (B) pourrait donner le 24-méthylène cholestérol (II) :

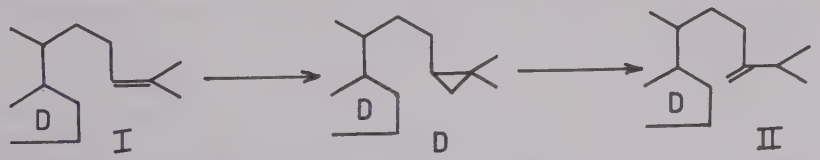


Deux autres possibilités doivent être envisagées :

a) le 24 méthyl cholestérol (III) pourrait donner, par oxydation du méthyle en 24, la substance C dont la déshydratation donnerait le 24-méthylène cholestérol (II) :



b) la méthylation du desmostérol (I) par la méthionine pourrait donner le dérivé cyclopropanique (D), par analogie avec la formation de l'acide lactobacillique à partir d'acide vaccénique (HOFMANN et LIU 1960) ; (D) pourrait donner directement, par isomérisation le 24-méthylène cholestérol (II).



Des essais ultérieurs permettront de préciser ces questions ; mais l'on peut déjà signaler que JAUREGUIBERRY (1964) a trouvé que dans le cas de l'ergostérol synthétisé par *Neurospora crassa*, il y avait transfert, à partir de la méthionine marquée, non pas d'un groupement CH_3 mais d'un groupement CH_2.

VILLANUEVA et BARBIER (1964) ont pu démontrer que la chaîne éthylidène du fucostérol isolé d'une algue brune *(Laminaria saccharina)* provenait de la double méthylation par la méthionine.

Quant au sitostérol, CASTLE (1963) a montré, qu'en incorporant de la méthionine marquée dans *Pisum sativum*, on retrouvait dans sa chaîne latérale les carbones 28 et 29 marqués.

Enfin BADER (1964) a apporté la preuve expérimentale d'une double méthylation par la méthionine dans le cas du spinastérol biosynthétisé par *Menyanthus trifolia*.

BIBLIOGRAPHIE

ALEXANDER G. J., SCHWENK E., 1957 - Transfer of the methyl group of methionine to carbon 24 of ergosterol. J. Am. Chem. Soc., *79*, 4 554-4 555.

BADER S., GUGLIEMETTI L., ARIGONI D., 1964 - The origin of the ethyl side chain in spinasterol. Proc. Chem. Soc., 16.

CASTLE M., BLONDIN G., NES W.R., 1963 - Evidence of the origin of the ethyl group of β-sitosterol. J. Am. Chem. Soc., *85*, 3 306-3 308.

HOFFMANN K., LIU T. Y., 1960 - Lactobacillic acid biosynthesis. Biochim. Biophys. Acta *35*, 364-365.

JAUREGUIBERRY G., LAW J. H., MAC CLOSKEY J. A., LEDERER E., 1964 - Sur le mécanisme biochimique de la C-méthylation. Compt. Rend. Acad. Sciences. *258*, 3 587-3 589.

JOHNSON D. H., BENNETT D. R., HEFTMANN E., 1963 - Cholesterol in higher plant. science *140*, 198-199.

TOKES W. M., HICKEY F. C., FISH W. A., 1958. J. Biol. Chem., *232*, 347.

TSUDA K., AKAGI S., KISHIDA Y., HAYATSU R., SAKAI K., 1958 - Steroid studies IX. Sterol from ocean algae. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), *6*, 724-727.

TSUDA K., AKAGI S., KISHIDA Y., 1957 - Discovery of cholesterol in some red algae. Science *126*, 927-928.

TSUDA K., AKAGI S., KISHIDA Y., 1958 - Cholesterol in some red algae. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), *6*, 101-104.

VILLANUEVA V., BARBIER M., LEDERER E., 1964 - Sur la biosynthèse de la chaine latérale éthylidène du fucostérol par double méthylation par la méthionine, Bull. Soc. Chim. France. 1423-1424.

CHAPITRE V

ETUDE DES FRACTIONS STÉROLIQUES DE DIFFÉRENTS VÉGÉTAUX

Pour vérifier si l'hypothèse de biosynthèse présentée au chapitre précédant pouvait être élargie nous avons étudié des fractions insaponifiables de différents végétaux.

Nous avons successivement travaillé sur les graines de Colza (*Brassica rapa*, variété Printemps Regina de Vilmorin Andrieux), sur une algue de la famille des Bacillariophytae : *Nitzschia clostarium* (souche de l'Institut français du pétrole, prélèvement Brandilly) et sur une levure : *Rhodotorula mucilaginosa* (souche RJ_1 et mutant MRP)*.

I - STEROLS DE LA GRAINE DE COLZA

L'extrait alcoolique de graines broyées est saponifié ; la chromatographie sur acide silicique de la fraction insaponifiable nous a fournis aux élutions benzène-éther 9:1 des cristaux F 140-142°, α_D = - 21 ($CHCl_3$) ; après acétylation les cristaux fondent entre 131 et 138° et α_D = - 18 ($CHCl_3$) ; l'hydrogénation conduit à un produit cristallisé F 131-138°, α_D = + 8,5 ($CHCl_3$).

Il s'agit ici, comme dans le cas du pollen, d'un mélange de stérols, mais seuls sont présents ceux en C_{28} et C_{29}.

En étudiant les spectres de masse des stérols et de leurs dérivés nous retrouvons les coupures correspondantes aux ruptures a et b :

m/e : 255 et 213 dans le cas du stérol et de son acétate,

m/e : 257 et 215 dans le cas de l'acétate hydrogéné,

les masses moléculaires étant, dans le cas des stérols, M = 414 et 412, 400 et 398, ce qui montre que les carbones supplémentaires sont dans la chaîne latérale.

Après hydrogénation de l'acétate nous n'avons plus que deux pics de masse à 456 et 442 auxquels correspondent

m/e : 456 - 60 = 396

m/e : 442 - 60 = 382

Une ozonisation de ces stérols suivie d'un entraînement à la vapeur nous a permis de recueillir les aldéhydes formés dans une solution de chlorydrate de 2,4-dinitro phénylhydrazine et d'identifier, par chromatographie sur papier l'acétaldéhyde et le formaldéhyde, ce qui tendrait à prouver que les stérols M 398 et M 412 sont des stérols ayant la même chaîne latérale que le 24-méthylène cholestérol et le fucostérol.

Une réaction d'Oppenauer faite sur ce mélange, nous donne avec un bon rendement une cétone insaturée présentant un maximum à 240 mμ, maximum des 3-céto Δ_4 stéroïdes (ε = 19000) dans l'éthanol).

Différentes en cela du pollen, les graines de Colza ne contiennent pas de stérols en C_{27} en quantité décelable mais l'on y trouve des stérols ayant la même chaîne latérale que le β-sitostérol, le campestérol, le fucostérol et le 24-méthylène cholestérol.

---

* Ces stérols nous ont été fournis par le Dr. Villoutreix de la Faculté de Pharmacie de Nancy, nous tenons à l'en remercier.

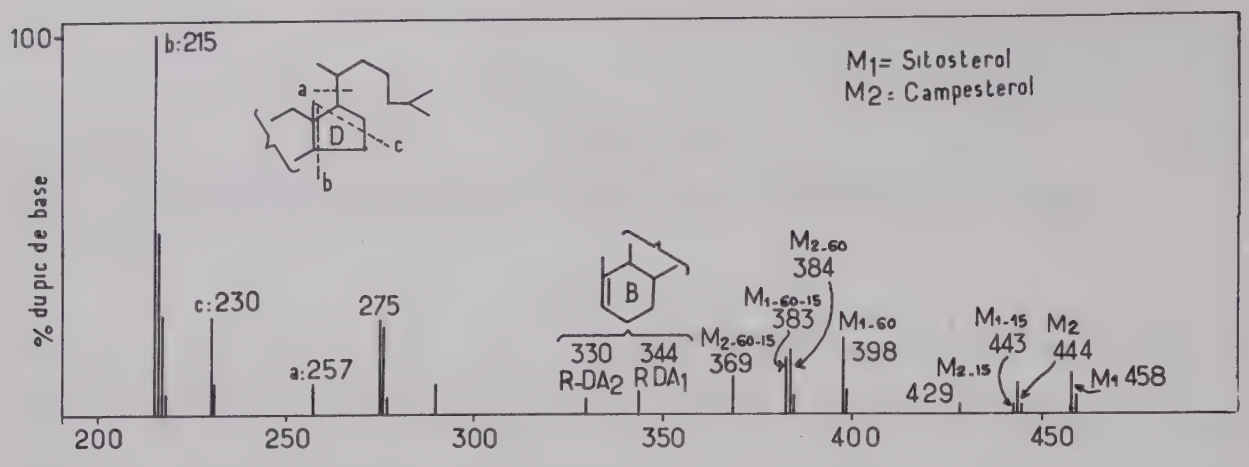


Fig. 5 - Spectre de masse de l'acétate des stérols isolé de la graine de colza *(Brassica rapa)*.

II - STEROLS DE NITZSCHIA CLOSTARIUM

Cette algue fait partie de la famille des Bacillariophycae (groupe des Bacillariales).

Cette diatomée a été cultivée sur milieu synthétique ; elle se présente au microscope sous forme de batonnets.

Après filtration du milieu de culture, le résidu est séché puis extrait à l'alcool.

Suivant la technique habituelle nous avons saponifié puis chromatographié la fraction neutre sur acide silicique ; les fractions éluées par le mélange benzène : éther 95:5 ont une réaction de Liebermann positive ; elles cristallisent en plaquettes dans le méthanol F 133-138°.

L'acétate donne quelques cristaux F 125-131°, α_0 = - 29 ($CHCl_3$).

Ayant très peu de matière première nous n'avons pu faire le spectre de masse que sur cet acétate ; nous y trouvons le présence de quatre stérols :

- un stérol en C_{27} à chaîne saturée :

m/e à M - 60 = 368

M - 60 - 15 = 353

- deux stérols en C_{28}, l'un à chaîne saturée :

m/e à M - 60 = 382

M - 60 - 15 = 367

l'autre possédant une double liaison supplémentaire dans le chaîne :

m/e à M - 60 = 380

M - 60 - 15 = 365

- un stérol en C_{29} à chaîne saturée :

m/e à M - 60 = 396

M - 60 - 15 = 381

L'on peut observer aussi les coupures a et b à m/e = 255 et 213.

On peut penser qu'il s'agit des stérols ayant la même chaîne que le β-sitostérol, le campestérol, le 24-méthylène cholestérol ou le brassicastérol (nous n'avons pu faire l'ozonisation qui aurait tranché la question) et enfin du cholestérol.

Nous retrouverions donc, dans cette algue, la même série de stérols déjà obtenue dans les pollens et dans les graines de Colza.

L'ensemble de ces résultats se trouve également en accord avec ceux récemment publiés par DUPERRON, VETTER et BARBIER (1964) de l'analyse des stérols de spores de fougères *(Dryopteris filix-mas)* : cette analyse a en effet montré la présence dans cette fraction des stérols en C_{27}, C_{28} et C_{29}.

III - STEROLS DE RHODOTORULA MUCILAGINOSA

Ils proviennent de la concentration des solutions éthéro-pétroliques des caroténoïdes et purification des cristaux ainsi obtenus au moyen d'une cristallisation dans le méthanol ; on a des plaquettes F 145-153°, α_D = - 120 ($CHCl_3$).

Le spectre dans l'ultra-violet présente 4 maximums (dans le cyclohexane) :

262 mμ : ε = 7 400 — 273 mμ : ε = 12 000

284 mμ : ε = 15 000 — 295 mμ : ε = 7 400

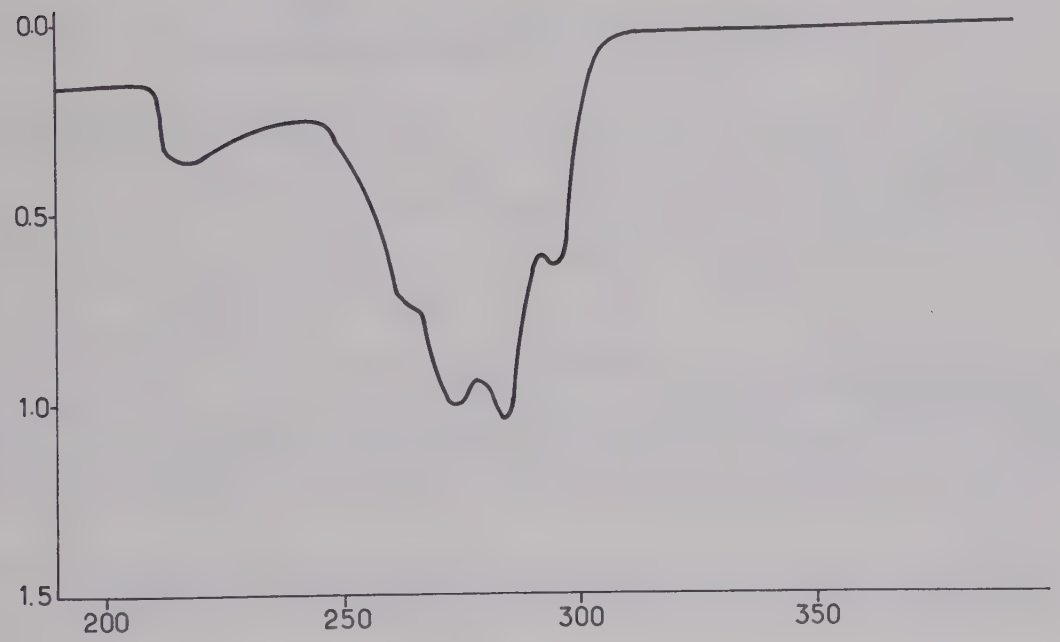


Fig. 6 - Spectre ultra-violet du stérol isolé de *Rhodotorula mucilaginosa.*

Ce spectre est semblable à celui de l'ergostérol.

Sur chromatoplaque son comportement est semblable à celui de l'ergostérol témoin, la révélation au trichlorure d'antimoine fait apparaître une impureté bleue ne migrant pas : vraisemblablement un dérivé (ce qui expliquerait la présence d'une absorption supplémentaire à 208 mμ : ε = 1 400).

La spectrométrie de masse appliquée au stérol, son acétate et son acétate hydrogéné (partiellement) montre qu'il s'agit d'un stérol M = 396 correspondant à la formule brute $C_{28}H_{44}O$.

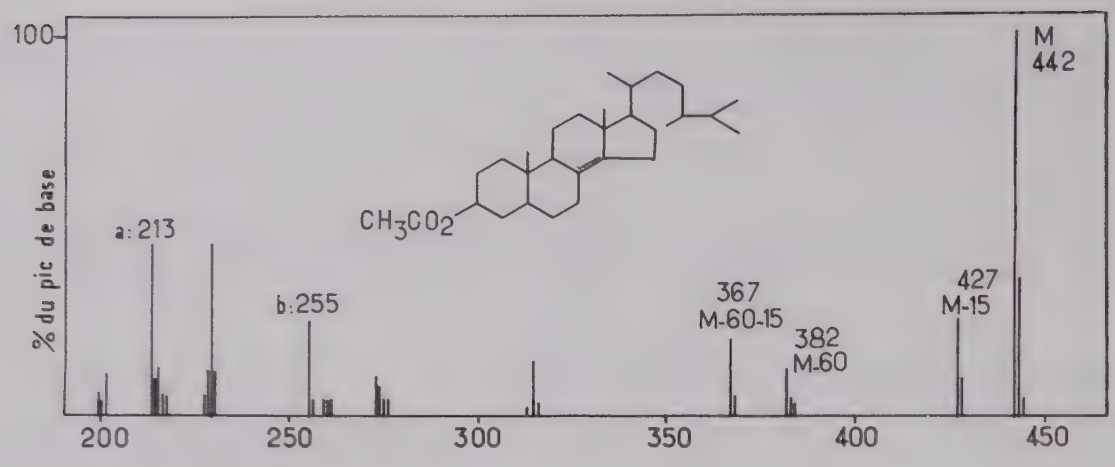


Fig. 7 - Spectre de masse de l'acétate hydrogéné du stérol isolé de *Rhodotorula mucilaginosa*.

On remarque aussi que ce stérol possède une chaîne latérale ayant un méthyle supplémentaire : coupure a et b à :

m/e = 253 et 211 pour le stérol et son acétate

m/e = 255 et 213 pour l'acétate partiellement hydrogéné.

Cette chaîne latérale est insaturée comme le montrent les coupures a et b mais cette insaturation ne provient pas d'un groupement méthylénique car nous n'avons pas trouvé trace des bandes à 6,1 et 11,3 μ dans le spectre infra-rouge.

Les pics de masse sont respectivement 396 pour le stérol

M - 60 = 378 pour son acétate

M = 442 et M - 60 = 382 pour l'acétate partiellement hydrogéné.

On obtient l'acétate dans les conditions habituelles, ce sont des cristaux F 167-172°, α_D = - 67 ($CHCl_3$) : acétate d'ergostérol F 181°, α_D = - 90 ($CHCl_3$).

Il est vraisemblable que durant l'hydrogénation de cet acétate, la double liaison en 7-8 migre en position 8-14 peut-être grâce au catalyseur (SANCY 1954) ; il est impossible dans les conditions où nous avons opéré d'hydrogéner une telle double liaison. Le point de fusion de cet acétate partiellement hydrogéné est 120-125° et α_D = + 8 ($CHCl_3$) ; l'acétate de Δ_{8-14}-ergosténol fond à 131° et α_D = + 11 ($CHCl_3$).

Nous avons vérifié ces résultats sur différentes fractions de cette souche et sur un de ses mutants : nous avons pu voir que le stérol prédominant semble bien être l'ergostérol.

PARTIE EXPERIMENTALE

I - STEROLS DES GRAINES DE COLZA

On extrait 1 kg de graines par 5 fois 1 litre d'alcool à 95°. On obtient ainsi 50 g d'extrait brut qui, séché se présente sous forme d'un solide brun (5 % du poids sec).

- Saponification :

On laisse trois heures à reflux avec 100 cm^3 de potasse méthanolique (2N) ; après extraction on obtient 3 g d'insaponifiable (66 % de l'extrait) ; on chromatographie cet insaponifiable sur 60 g d'acide silicique, les élutions sont de 30 cm^3 :

1-3	Benzène	54 mg
4	Benzène-éther 95-5	traces
5	Benzène-éther 9:1	71
6	"	693
7	"	100
8	"	46
9-10	Benzène-éther 4:1	28
11-12	Benzène-éther 1:1	77
13-14	Ether	11
15	Ether-méthanol 4:1	0

Par cristallisation des fractions 6-7 (1,6 % de l'extrait) nous obtenons des stérols (réaction de Liebermann bleu-vert) F 140-142°, α_D = - 21 ($CHCl_3$).

- Acétylation :

Nous avons acétylé 40 mg de ces stérols dans 3 cm^3 de pyridine et 2,5 cm^3 d'anhydride acétique, une nuit à 37° ; après cristallisation dans le méthanol l'acétate fond à 130-134°, α_D = - 18 ($CHCl_3$).

- Hydrogénation de l'acétate :

L'hydrogénation de cet acétate (20 mg dans 3 cm^3 d'acide acétique, 1 heure sous hydrogène en présence de 20 mg de PtO_2) conduit à des cristaux F 131-138°, α_D = + 8,5 ($CHCl_3$).

- Ozonisation de l'acétate :

Nous avons mis à ozoniser durant 40 minutes 25 mg dissous dans 5 cm^3 d'acide acétique ; les aldéhydes formés ont été entraînés à la vapeur et recueillis dans une solution de chlorydrate de 2,4 dinitrophénylhydrazine ; le précipité est centrifugé ; nous avons caractérisé le formaldéhyde et l'acétaldéhyde grâce à la technique de la chromatographie radiale décrite au chapitre III (p. 34) : les R_f sont respectivement de 0,4 et 0,7.

- Réaction d'Oppenauer :

(Voir les détails p. 34) ; on fait réagir 25 mg de stérols dissous dans 5 cm^3 de toluène avec 250 mg d'isopropylate d'aluminium en suspension dans 5 cm^3 de toluène en présence de 1 cm^3 de cyclohexanone. On lave au sel de Seignette, puis entraîne à la vapeur d'eau la cyclohexanone restante. On obtient 22 mg (rendement 88 %) d'un produit absorbant dans l'ultraviolet à 241 mμ et ayant un ε = 19000 (spectre fait dans la cyclohexanone).

II - STEROLS DE NITZSCHIA CLOSTARIUM

2 g de cette algue sont extraits par l'alcool ; on obtient 455 mg (25 % du poids sec) d'un extrait vert à odeur forte.

Cet extrait est saponifié 3 heures avec 10 cm^3 de potasse méthanolique (2N).

La fraction neutre, 36 mg (1,8 % du poids sec) est chromatographiée sur 2 g d'acide silicique, les élutions sont de 10 cm^3 :

1-3	éther de pétrole-benzène 1:1	2 mg
4-5	benzène	traces
6	benzène-éther 95:5	5
7	"	13
8-9	"	traces
10-11	benzène-éther 9:1	0

12-13	benzène-éther 4:1	0
14-15	benzène-éther 1:1	0
16-17	éther	0
18-19	éther-méthanol 4:1	10

Les fractions 6-9 ont une réaction de Liebermann positive (bleue verte) ; cristallisées dans le méthanol elles fournissent des plaquettes F 133-138°.

- Acétylation :

10 mg sont acétylés 1 nuit à 37° avec 0,5 cm^3 de pyridine et 0,4 cm^3 d'anhydride acétique. Après extraction et cristallisation, on obtient un produit F 125-131°, α_D = - 21 ($CHCl_3$) que l'on a étudié en spectrométrie de masse.

BIBLIOGRAPHIE

DUPERRON P., VETTER W., BARBIER M., 1964 - Sur la fraction insaponifiable des spores de fougères *Polystichum filix-mas L.* Phytochemistry, *3*, 89-91.

SANCY G., GEISTLICH P., HELBING R., HEUSSER H., 1954- Ueber Steroïde und Sexualhormone. Helv. Chim. Acta, *37*, 250-257.

CHAPITRE VI

ANALYSE DES STÉROLS D'INSECTES PHYTOPHAGES

Les premiers travaux effectués sur l'abeille *Apis mellifica L.* par BARBIER (1959 et 1960) ont permis de montrer que le stérol prépondérant est le 24-méthylène cholestérol, comme dans les pollens ; le cholestérol existe aussi en faible quantité.

Ayant à notre disposition deux autres insectes phytophages : la termite *Calotermes flavicollis* (VERRON 1962) et le grillon *Gryllus domesticus*, nous avons recherché dans les fractions insaponifiables la présence des stérols et avons essayé de retrouver la même filiation que dans les pollens et chez l'abeille. Les analyses effectuées en spectrométrie de masse montrent que le cholestérol est le stérol prédominant chez ces deux insectes (tableau 6).

Tableau 6

Insecte	Origine	Constantes du stérol	Identification du stérol
Termite *Calotermes flavicolis*	Banyuls bois de vigne	F 138-141° acétate F 106-120° α_D = - 38,2	cholestérol 70 % stigmastérol β-sitostérol stérol ayant un CH_2 de plus dans la partie cyclique.
Grillon *Gryllus domesticus*	élevage sur salade et son	F 138-141° α_D = - 50,6 acétate F 114-116° α_D = - 40	cholestérol 90 % autres stérols : analyse impossible intensité des pics trop faible.
Abeille *Apis mellifica L.*	Station de recherches sur l'abeille, Bures-sur-Yvette.	F 138-140° α_D = - 31,6	Stérols en C_{27}, C_{28}, C_{29} (dont le 24 méthylène cholestérol): pas plus de cholestérol que dans le pollen.

L'identification du cholestérol comme stérol principal d'insectes phytophages a déjà été décrit. Par exemple les chrysalides de *Bombyx mori* contiennent environ 85 % de cholestérol et 15 % de β-sitostérol (BERGMANN 1934). Selon LEVINSON (1960) le cholestérol serait présent dans les insectes appartenant aux ordres des Coléoptères, Diptères, Hyménoptères, Lépidoptère et Orthoptères.

Les insectes ne pouvant effectuer la biosynthèse des stérols (CLARK et BLOCH 1963), on doit admettre que chez les insectes phytophages le cholestérol est obtenu par dégradation de la chaîne latérale des phytostérols. KODICEK et LEVINSON (1960) ont prouvé en effet que *Calliphora erytrocephala* dégradait le β-sitostérol en cholestérol. Selon LEVINSON (1960), cette dégradation serait un phénomène général chez les insectes phytophages. CLAKK et BLOCH (1959) ont pu montrer que *Blatella germanica* transformait l'ergostérol en 22-déhydrocholestérol.

La signification biologique de cette transformation des phytostérols en cholestérol n'est pas connue. On sait que les insectes ne peuvent vivre sans stérols.

Selon CLAYTON et BLOCH (1963) le cholestérol pourrait être un constituant indispensable de la structure cellulaire de l'insecte. D'après les résultats récents de KARLSON et HOFFMEISTER (1963) le cholestérol est le précurseur biologique de l'ecdysone.

Il semblerait, comme CLARK et BLOCH (1959) l'avaient supposé que le 24-méthylène cholestérol est directement utilisé par l'insecte au même titre que le cholestérol.

I - STEROLS DU TERMITE*

Les termites ont été extraits par l'éther. Les extraits concentrés ont ensuite été séparés en parties neutres et acides par le carbonate de sodium (2N). Le tableau suivant résume les résultats de ces opérations :

Tableau 7

Poids sec de termites après les extractions		11,850 g
Extrait total par l'éther (3 extractions)		4,880
Partie neutre		4,550
Partie acide		0,328
Saponification de 1,230 g de partie neutre :	neutre	0,184
	acide	0,650

La partie insaponifiable a été chromatographiée sur colonne d'acide silicique Mallinckrodt. Le mélange benzène-éther 95:5 élue une fraction donnant une réaction de Liebermann fortement positive. Cette fraction cristallise dès l'adjonction de méthanol, F 120-128°. Après deux recristallisations dans le méthanol, on obtient des plaques incolores F 138-141°. Nous avons préparé un acétate par action de l'anhydride acétique dans la pyridine. Après cristallisation dans le méthanol cet acétate fond à 106-120°, α_D = - 38,2 ($CHCl_3$).

La réaction d'Oppenauer donne avec un rendement de 80 % une cétone α,β insaturée (λ_{max} éthanol: 241 mμ, ε = 17 500).

La chromatographie de ce stérol sur plaque d'acide silicique (système benzène-acétate d'éthyle 7:3) ne donne, après révélation par le chlorure d'antimoine, qu'une tache de R_f = 0,62.

La chromatographie en phase vapeur (sur une colonne de SE 30 à 3 %) fournit 2 pics. Le volume de rétention du pic principal est identique à celui d'un échantillon authentique de cholestérol et celui du second pic à celui d'un échantillon de stigmastérol. Cet essai a été répété avec un témoin interne de cholestérol. La comparaison des aires des pics obtenus, donne les valeurs approximatives suivantes : 80 % pour le pic du cholestérol et 20 % pour celui du stigmastérol.

La composition de ce mélange de stérols a ensuite été étudiée par spectrométrie de masse (pour les détails sur le comportement des stérols par spectrométrie de masse voir Chapitre III). La présence d'un pic important à la masse 368 à la fois dans le spectre des stérols et dans celui de l'acétate, montre que le composé principal est probablement le cholestérol : ce pic résulte de la perte du OH dans le premier cas et du radical acétyle dans le second. L'intensité relative de ces pics indique environ 70 % de ce stérol. Un pic de faible intensité correspond au pic attendu pour le stigmastérol (394). Le pic à m/e = 396 indique la présence d'un composé possédant soit un éthyle (β-sitostérol), soit 2 méthyles de plus que le cholestérol dans la chaîne latérale. Des pics à m/e = 366 et 392 révèlent la présence de substances possédant une double liaison de plus que le cholestérol et le stigmastérol. Enfin, on observe à m/e = 382 le pic de masse d'un composé ayant un méthyle de plus que le cholestérol ; ce méthyle n'est pas dans la chaîne latérale, ainsi qu'il ressort de la présence d'un pic à m/e = 269. Ce dernier pic montre en effet que le méthyle est sur l'un des cycles (l'ensemble des quatre cycles et des deux méthyles, comme pour le cholestérol par exemple, représente une masse de 255). La présence d'un stérol possédant un méthyle supplémentaire dans l'un des cycles (comme le lophénol) a également été signalé par SCHREIBER

---

* Ce travail fut effectué par Mme Duperron, nous tenons à l'en remercier vivement.

(1961) dans la fraction stérolique du doryphore, *Leptinotarsa decemlineata* Say, où il accompagne le β-sitostérol. Ces auteurs (1963) ont récemment montré que ce stérol était présent dans les feuilles de la pomme de terre, *Solanum tuberosum* et qu'il s'agissait du 3β-hydroxy 4α-méthyl 7,24-(28) stigmastadiène (α_1-sitostérol).

La fraction stérolique acétylée, en solution dans le cyclohexane, n'a pas d'absorption notable dans le spectre ultra-violet dans l'intervalle 230-310 mμ.

II - STEROLS DU GRILLON*

1 kg de grillons (nourris exclusivement sur salade et son) a été extrait par l'alcool. Les extraits concentrés ont été repris par l'éther et séparés en fractions neutres et acides par le carbonate de sodium (2N).

Une saponification a été effectuée par la potasse méthanolique ; la fraction insaponifiable a été chromatographiée sur colonne d'acide silicique Mallinckrodt. Les éluats obtenus avec le mélange benzène-éther 98:2 donnent une réaction de Liebermann positive. Après cristallisation dans le méthanol, on obtient des cristaux F 138-141°, α_D = - 50 ($CHCl_3$). Ces stérols ne montrent pas d'absorption particulière en ultraviolet. Le spectre infra-rouge est identique à celui du cholestérol authentique. La réaction d'Oppenauer fournit une cétone α,β insaturée, avec un rendement de 80 % (λ_{max} éthanol : 241 mμ, ε = 16 000). La chromatographie sur plaque dans les mêmes conditions que précédemment, ne donne qu'une tache révélable par $SbCl_3$, au même R_f que le cholestérol.

La chromatographie en phase gazeuse a été effectuée dans les mêmes conditions que pour l'analyse des stérols de *Calotermes flavicollis*. On observe un seul pic, de même volume de rétention que le cholestérol (position vérifiée par répétition avec un témoin interne de cholestérol authentique).

Un acétate a été préparé par action de l'anhydride acétique dans la pyridine F 114-116°.

La spectrométrie de masse fournit un pic important à m/e = 368 correspondant au cholestérol, à la fois pour le stérol et son acétate (M-18 dans le premier cas et M-60 dans le second cas) comme dans le cas de l'insaponifiable de termites. D'après l'intensité relative de ces pics, on peut évaluer à environ 90 % la quantité de cholestérol présent dans le mélange.

On observe la présence en faibles quantités d'un stérol ayant soit un éthyle (β-sitostérol) soit 2 méthyles supplémentaires dans la chaîne latérale (pic à m/e=396) et d'un stérol possédant une double liaison de plus que le cholestérol (m/e=366).

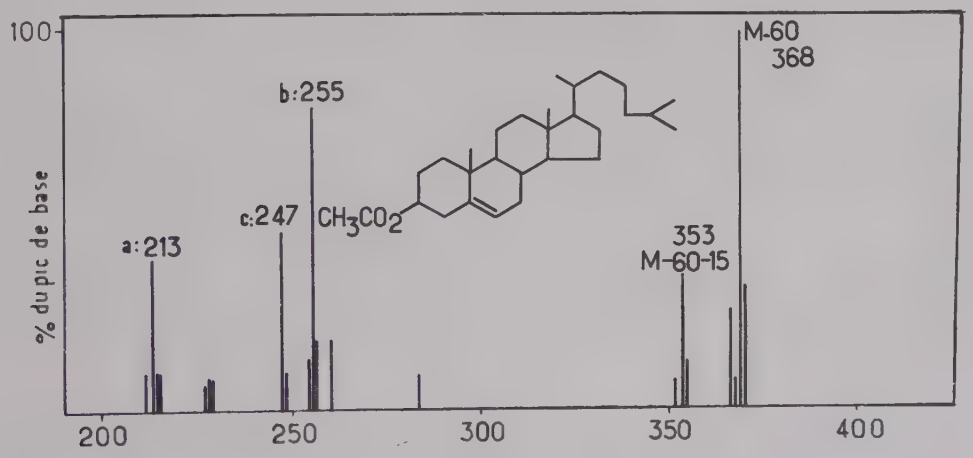


Fig. 8 - Spectre de masse du stérol isolé du grillon *(Grillus domesticus)*.

---

* Nous remercions Mr. Sipal de l'aide qu'il nous a apportée lors de ce travail.

III - STEROLS DE L'ABEILLE

Nous avons effectué la spectrométrie de masse sur une fraction cristallisée F 138-140°, α_D = - 31,6 ($CHCl_3$), ainsi que sur les eaux-mères de cristallisation. On observe la série des pics déjà signalée pour les stérols en C_{27}, C_{28} et C_{29} du pollen (Chapitre III) et ceci avec des intensités comparables, le 24-méthylène cholestérol étant le stérol le plus abondant.

PARTIE EXPERIMENTALE

STEROLS DU GRILLON

1 kg de grillons sont extraits 3 fois par 1 litre l'alcool. Après évaporation sous vide on obtient 36,5 g d'un sirop brun foncé (3,6 % du poids).

- Séparation par le carbonate :

Une première séparation a été effectuée entre l'éther (3 fois 20 cm³) et le carbonate de sodium (3 fois 20 cm³). L'éthéro-soluble est lavé à l'eau (3 fois 20 cm³) puis séché sur sulfate de sodium et amené à sec : on obtient 7,006 g de fraction neutre (0,7 % du poids).

- Saponification :

On saponifie 5,150 g par 20 cm³ de potasse méthanolique (2N) durant 3 heures. Après extractions à l'éther la fraction insaponifiable est amenée à sec : on obtient 249 mg (0,04 % du poids d'insectes) d'un solide brun que l'on chromatographie sur 13 g d'acide silicique, les élutions sont de 20 cm³ :

1	Ether de pétrole-benzène 1:1	15 mg
3-6	Benzène	11
7-10	Benzène-éther 49:1	20
11	"	117
12	"	62
13	"	traces
14-15	Benzène-éther 19:15	4
16-18	Benzène-éther 1:1	16
19-21	Ether	7

Les fractions 11 (F 131-134°) et 12 (F 134-138°) ont été réunies et cristallisées dans le méthanol : on obtient ainsi 54,3 mg de cristaux F 138-141°, α_D = - 30,5 ($CHCl_3$) (cholestérol F 149°, α_D = - 39).

- Acétylation :

23 mg dissous dans 1 cm³ de pyridine ont été acétylés 1 nuit à 37° avec 0,9 cm³ d'anhydride acétique. Par cristallisation dans le méthanol on obtient 9 mg de plaquettes incolores F 114-116° (acétate de cholestérol F 116°).

- Hydrogénation de l'acétate :

7,5 mg de cet acétate dissous dans 2 cm³ d'acide acétique ont été hydrogénés durant 20 minutes en présence de 9 mg de PtO_2. Les cristaux obtenus après extraction et cristallisation dans le méthanol fondent entre 110 et 112° (acétate de cholestanol F 111°, α_D = + 13).

- Réaction d'Oppenauer :

10 mg de stérol dissous dans 10 cm³ de toluène ont été mis au reflux 30 minutes en présence d'isopropylate d'aluminium (50 mg) et de cyclohexanone (1 cm³) ; après avoir lavé avec une solu-

tion de sel de Seignette, on entraîne à la vapeur d'eau la cyclohexanone restante : on récupère ainsi 8 mg de cétone brute qui présente un maximum d'absorption à 241 mμ (alcool) et un ε = 17 500. Le rendement est de 80 %.

BIBLIOGRAPHIE

BARBIER M., SCHINDLER O., 1959 - Isolierung von 24-Methylen-cholesterin aus Königinnen und Arbeiterinnen der Honigbiene. Helv. Chim. Acta, *42*, 1 998-2 005.

BARBIER M., REICHSTEIN T., SCHINDLER O., LEDERER E., 1959 - Isolation of 24-methylen cholesterol from Honey Bees (*Apis mellifica L*). Nature, *184*, 732-734.

BARBIER M., HUGEL M-F., LEDERER E., 1960 - Isolement du 24-méthylène cholestérol à partir du pollen de différentes plantes. Bull. Soc. Chim. Biol., *42*, 91-97.

BERGMANN W., 1934 - Bombicysterol. J. Biol. Chem., *107*, 527-532.

CLARK A. J., BLOCH K., 1959 - The absence of sterol synthesis in insects. J. Biol. Chem., *234*, 2 578-2 582.

CLARK A. J., BLOCH K., 1959 - Function of sterols in *Dermestes vulpinus*. J. Biol. Chem., *234*, 2 583-2 588.

CLARK A.J., BLOCH K., 1959 - Conversion of ergosterol to 22 dehydrocholesterol in *Blatela germinica*. J. Biol. Chem., *234*, 2 589-2 594.

CLAYTON R. B., BLOCH K., 1963 - Sterol utilisation in the Hide beetle, *Dermestes vulpinus*. J. Biol. Chem., *238*, 586-591.

KARLSTON P., HOFFMEISTER H., 1963 - Umwandlung von Cholesterin in Ecdyson. Z. Physiol. Chem., *331*, 298-300.

KODICEK E., LEVINSON Z. H., 1960 - Metabolism of β-sitosterol and other lipids in the presence of acetate 2-^{14}C by Blowfly larvae. Nature, *188*, 1 023-1 024.

LEVINSON Z. H., 1960 - The function of dietary sterols in phytophagous insects. XIth Intern. Kongress für Entomologie, Vienne, Symposium III, 145-153.

LEVINSON Z. H., 1960 - The evolution of sterol requirements. XIth Intern. Kongress für Entomologie, Vienne, Symposium III, 154-156.

SCHREIBER K., OSSKE G., SEMBNER G., 1961 - Identifizierung von β-Sitosterin als Hauptsterin des Kartoffelkäters, *Leptinotarsa decemlineata*, Say. Experientia, *17*, 463-464.

SCHREIBER K., OSSKE G., 1963 - Isolierung von 4α méthyl 5α stigmasta 7, 24 (28) dien 3β ol aus *Solanum tuberosum* sowie über die Identität dieser Verbindung mit α_1-Sitosterin. Experientia, *19*, 69-71.

VERRON H., BARBIER M., 1962 - L'hexane 3 ol-1, substance attractive des termites *Calotermes flavicollis* et *Microcerotermes edentatus*. Compt. Rend. Acad. Sciences, *254*, 4 089-4 091.

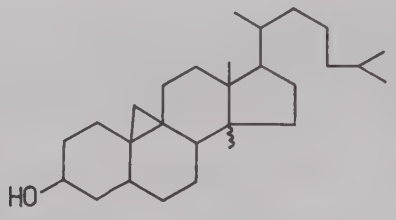
CHAPITRE VII

LE POLLINASTANOL

Nous avons vu dans le Chapitre III que les eaux-mères de cristallisation du stérol F 142-143° laissaient déposer des plaquettes incolores F 95°, α_0 = + 35 ($CHCl_3$).

Ces cristaux ont une réaction de Liebermann positive. La chromatographie sur couche mince dans le système pentane-acétate d'éthyle 7:3 ne montre qu'une tache de R_f comparable à celui du cholestérol (0,3) après révélation par le chlorure d'antimoine (coloration rouge).

Les divers résultats chimiques et spectrographiques nous ont permis d'avancer pour ce stérol la formule développée suivante :



Nous proposons pour cette substance le nom de pollinastanol.

Ce stérol étant caractérisé par un noyau cyclopropane très visible en spectrométrie RMN, le but de notre travail a été, tout d'abord, de vérifier que ce cycle n'avait pas été créé au cours des manipulations (comme dans le cas des i-stérols) ; pour cela nous avons cherché sa présence dans un extrait brut avant et après saponification. Ensuite nous l'avons localisé dans la fraction stérolique à l'exclusion de toute autre :

En même temps nous poursuivions l'étude du pollinastanol que nous avions isolé.

I - ANALYSE DE L'EXTRAIT NON SAPONIFIE

- Chromatographie de partage :

Nous avons fractionné l'extrait brut sur une colonne d'acide silicique imprégné d'eau : les fractions chloroformiques contiennent des esters de stérols qui présentent en RMN les mêmes bandes cyclopropanes que le stérol libre. Par saponification de ces fractions nous avons obtenu des stérols ayant un cycle propanique dans leur squelette.

- Chromatographie d'absorption :

Cette chromatographie faite sur acide silicique nous a permis de recueillir avec le benzène des esters de stérols (réaction de Liebermann positive) possédant en RMN les signaux du cycle propanique ; ces signaux se retrouvent dans le spectre de la fraction insaponifiable, la fraction acide ne présente aucun pic particulier.

II - ANALYSE DE L'EXTRAIT SAPONIFIE : FRACTION INSAPONIFIABLE

Nous trouvons le pollinastanol dans les eaux-mères du stérol F 142-143° (Chapitre III p. 27 et 33) en assez grande quantité (3 % du poids de l'insaponifiable total). Malheureusement nous n'avons pu en obtenir en tout que 382 mg et ceci à partir d'un pollen mixte.

Les tentatives faites pour obtenir ce stérol à partir d'espèces pures ou même d'un mélange différant du mélange initial ont échoué. Nous pouvons ainsi éliminer la présence de ce stanol dans les pollens suivants : heliantus *(Heliantus annus)*, moutarde *(sinapis alba)*, châtaignier *(Castanea sativa)*, lierre *(Hedere helix)*, saule *(Salix fragilis)*, tilleul *(Tilia cordata)*, plantain *(Plantago lanceolata)*, constituants d'un pollen mixte ; ciste *(Cistus labdaniferus)*, maïs *(Zea mays)*, seigle *(Secale cereale)*, et phléole des près *(Phleum pratense)*, ces derniers étant purs à 85 % environ.

Il n'a jamais été possible de connaître la composition exacte du pollen mixte dont nous avons extrait le pollinastanol.

ETUDE DU POLLINASTANOL (I)

L'analyse élémentaire de ce stérol nous montre qu'il s'agit d'un corps de formule brute $C_{28}H_{48}O$ (M = 400).

calculé :	C % 83,93	H % 12,06
trouvé :	C % 83,59	H % 11,86

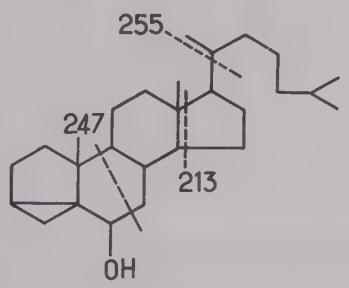
La masse moléculaire est confirmée par la spectrométrie de masse ; à côté de ce produit dominant nous trouvons environ 5 % d'un mélange de stérols $C_{29}H_{50}O$ et $C_{29}H_{48}O$, les variations se situant dans la chaîne latérale. Comme bien souvent lorsqu'il s'agit de stérols, le spectre est peu clair et c'est celui de l'acétate qui nous donnera les meilleurs résultats : nous pouvons cependant dire que ce stérol possède la même chaîne que celle du cholestérol (masse de 113), un méthyle supplémentaire et 2 hydrogènes en moins dans sa partie cyclique.

Le spectre RMN présente 2 doublets centrés à 0,43 ppm et 0,05 ppm attribuables aux 2 protons d'un groupement cyclopropanique formant un système AB (J = 4 cps). L'absence de couplage supplémentaire laisse supposer qu'il n'y a pas de protons sur les 2 autres carbones du cycle propanique. Vers 0,90 ppm résonnent les protons d'un certain nombre de méthyles : il est impossible de préciser le nombre et la position de ces méthyles. Vers 3,60 ppm est centré un multiplet large provenant du proton situé sur le même carbone que le OH en 3 ; la largeur à mi-hauteur et la position de ce signal indique que ce OH a la conformation équatoriale (d'après MUSHER (1961) si sa conformation était axiale le proton en α résonnerait à 4,10 ppm et sa largeur serait environ de 6,5 cps).

Il n'existe pas d'absorption notable au dessus de 210 mμ et l'on ne peut déceler d'insaturations dans le spectre infrarouge.

Des essais d'hydrogénation et d'ozonisation ainsi que la réaction d'Oppenauer laissent le produit inchangé.

Nous avions, au début de notre travail, pensé que ce stérol pouvait être un i-stérol (à cause de son point de fusion bas et de son pouvoir rotatoire positif), mais nous avons assez vite rejeté cette hypothèse car ces stérols sont des artéfacts provenant de la saponification d'esters (LIEBERMANN 1948 et 1954), ce qui n'est pas notre cas. Les spectres de masse de notre stérol, du i-cholestérol et du i-stérol obtenu par transposition du stérol F 142-143° sont très différents (MAC KENNA 1957 et STEELE 1963) ; dans le cas des i-stérols on observe 3 pics intenses à m/e = 213, 247 et 255 : (voir spectre de masse 1 de la figure 9)



La présence d'un OH β équatorial en position 3, déjà induite par le spectre RMN a été confirmé par l'obtention très facile d'un digitonide (PESEZ et POIRIER 1954) : on sait que ce dérivé est caractéristique des OH 3β.

Notons que le spectre infrarouge présente une bande hydroxyle très importante à 3 400 cm^{-1}.

A partir de ce pollinastanol nous avons fait plusieurs séries de dérivés que nous étudierons dans l'ordre suivant :

I) acétate de pollinastanol,

II) pollinastanone et ses dérivés,

III) dérivés obtenus après ouverture du noyau cyclopropanique.

I - ACETATE DE POLLINASTANOL (V)

C'est une huile, α_D = + 29 ($CHCl_3$) ; en chromatographie sur couche mince (pentane-acétate d'éthyle 9:1) son R_f = 0,7. Il répond à la formule brute $C_{30}H_{50}O_2$, M = 442.

Son spectre de masse très net présente les coupures suivantes :

m/e 442 = M

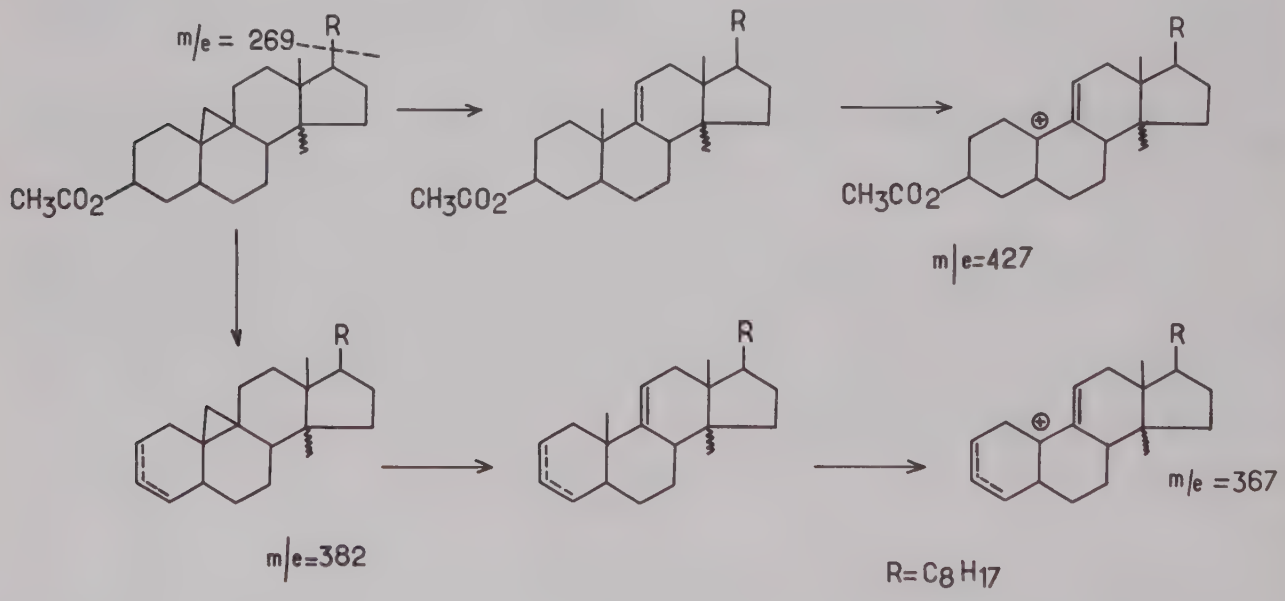
427 = M - 15 (très important, départ facile d'un méthyle)

382 = M - 60 (départ du groupe acétate)

367 = M - 60 - 15.

Il y a encore 1 % d'impuretés (homologue supérieur et dérivé éthylénique : on trouve, les caractérisant, 2 pics à m/e = 396 et 394 ; les deux fusionnent à m/e = 396 lorsqu'on hydrogène ce mélange).

Le spectre possède un très grand pic à m/e = 269 (255 + 14) caractérisant la perte de la chaîne latérale (de masse 113 comme celle du cholestérol). Notons l'absence du pic à m/e = 227 (213 + 14) correspondant à une rupture du cycle D, rupture qui se produit lorsque l'on a à faire aux stérols du type cholestérol, coprostanol :



Le pic à 269 prouve :

- l'existence d'un méthyle supplémentaire dans la partie cyclique de la molécule,

- l'existence d'un OH,

- montre qu'il manque 2 H pour que sa masse soit celle d'un acétate de méthyl-4 cholestanol (M = 444) : le spectre de ce dernier est d'ailleurs fort différent de celui de l'acétate de pollinastanol : il présente un grand pic à 229 tandis que celui à 271 est faible.

- on peut ajouter aussi qu'un méthyle s'élimine très facilement ; il pourrait être allylique à une double liaison, par exemple celle que donnerait le cyclopropyle en s'ouvrant.

Ce spectre est comparable à ceux des triterpènes tétracycliques ayant un noyau cyclopropane en 18-10 (cycloartenol, cycloeucalénol, cyclolaudanol, 24-méthylène cycloarténol). On y trouve une rupture a très nette (rupture de la chaîne) :

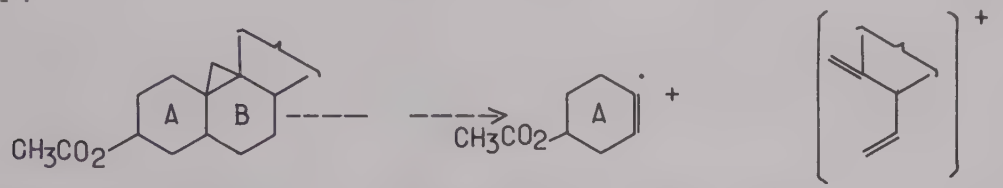
m/e = 297 pour le cycloarténol et cyclolaudénol,

m/e = 283 pour le cycloeucalénol,

m/e = 269 pour le pollinastanol.

Ils n'ont pas de rupture b (rupture du cycle D), ce qui est classique dans le cas des stérols type cholestérol.

Tous ces spectres présentent en basse tension un pic pair de faible intensité situé entre m/e = 280 et m/e = 300 ; ce pic est indépendant de la fonction en 3 : le cyclolaudanne et le 3β acétoxy laudanne donnent le même pic à m/e = 300 ; il est indépendant du substituant en 4 : le 3 acétoxy cycloeucalénol et le 3β acétoxy cycloarténol ont toujours le pic à m/e = 300 ; il dépend de la chaîne latérale : il est à m/e = 286 pour l'acétoxy cycloarténol, m/e = 300 pour l'acétoxy cyclolaudanol et m/e = 288 pour l'acétate de pollinastanol. On pourrait envisager une coupure comme celle-ci :



Les pics à m/e = 269 et m/e = 288 indiquent que le méthyle supplémentaire ne peut se trouver que dans les cycles B, C ou D.

II - POLLINASTANONE (II) ET DERIVES

Par oxydation chromique (POOS et ARTH 1953) du pollinastanol (I), nous obtenons une cétone (II) d'apparence huileuse que l'on purifie par chromatographie préparative sur couche mince (pentane-acétate d'éthyle 9:1, R_f = 0,3).

La valeur et le sens de son dichroïsme circulaire (+ 0,83) sont sensiblement les mêmes que ceux de la 3-cholestanone (+ 1,1) et de la cycloeucalenone (+ 0,91) (WITZ et HERMANN 1963 et MASON 1963).

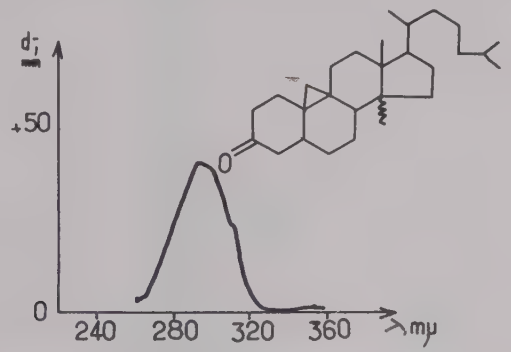
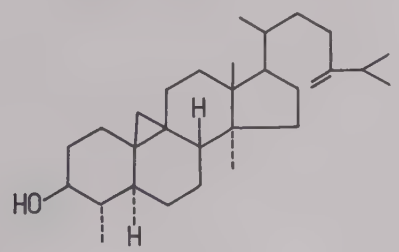


Fig. 10 - Courbe de dichroïsme circulaire de la pollinastanone.

Le cycloeucalenol isolé par COX et KING (1956, 1957, 1959)



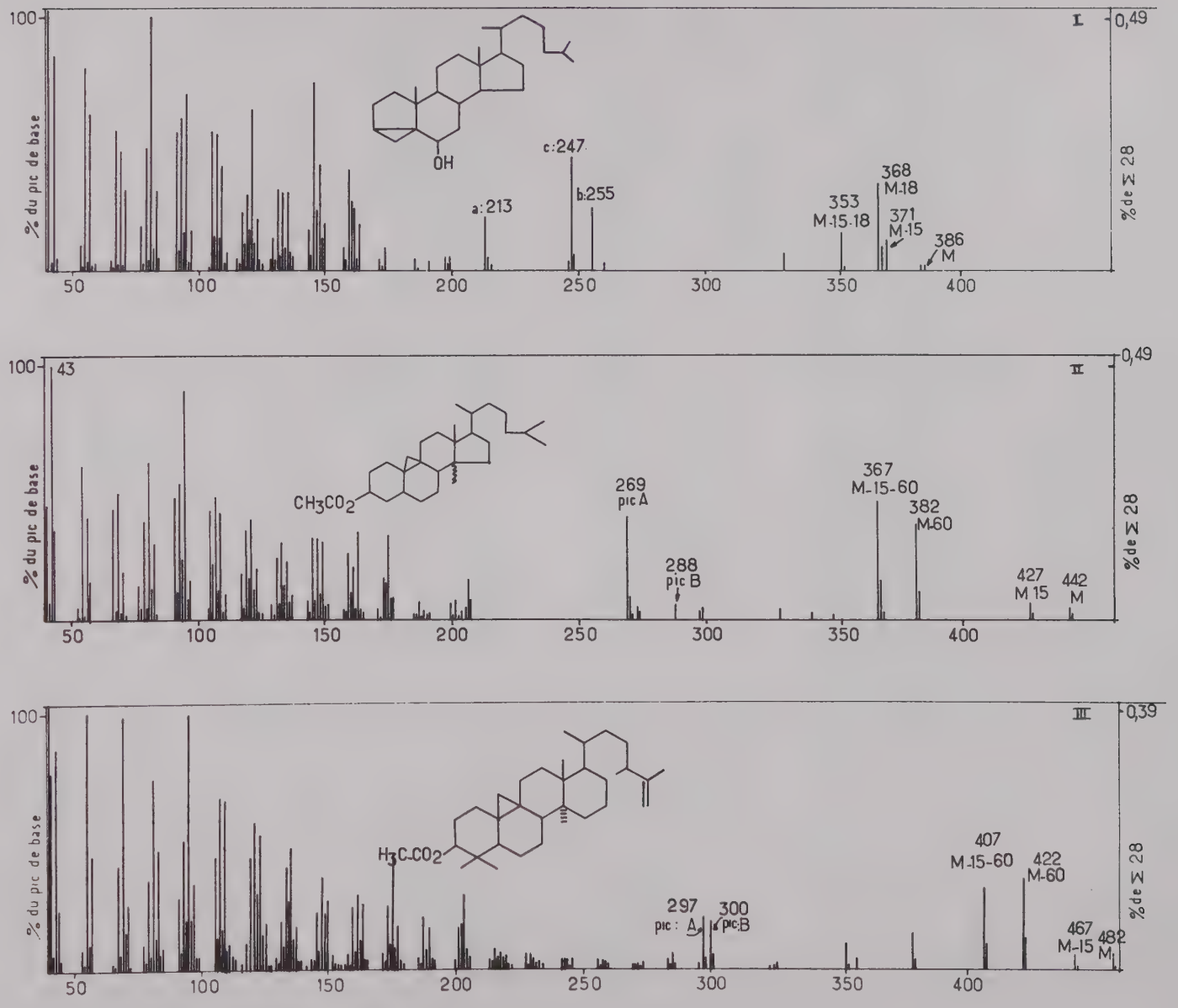
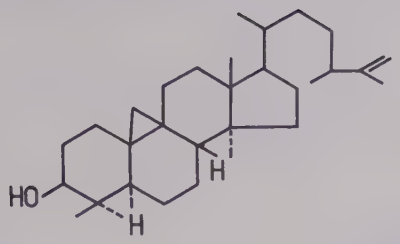
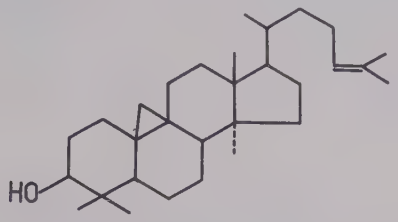


Fig. 9 - Spectres de masse de :
I - i-cholestérol ; II - acétate de pollinastanol ; III - acétate de cyclolaudenol.

le cyclolaudenol isolé par BENTLEY (1955)

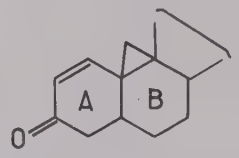


ainsi que le cycloarténol isolé par BARTON (1951) et étudié par BENTLEY (1953) et IRVINE (1955)



sont des triterpènes possédant un cycle propanique extra cyclique.

La preuve apportée par IRVINE (1955) à la localisation d'un tel noyau est la création d'un système conjugué du type :



Ce système présente une double absorption dans l'ultra-violet à 205 mμ (α = 5 000) et 269 mμ (ε = 8 700).

Nous avons bromé la pollinastanone (II) suivant la méthode préconisée par MARQUET (1961) de façon à ce que la fixation se fasse sélectivement sur le carbone 2 en α de la cétone. Après déshydrobromhydration par la collidine nous avons purifié la cétone obtenue (III) sur une colonne d'alumine et recueilli avec le mélange benzène-éther 1:1 une huile qui en ultraviolet présente les maximums d'absorption : $\lambda_{206m\mu}$ ε = 5 900 et $\lambda_{269m\mu}$ ε = 8 200. Nous pouvons donc avancer que le cycle propanique se trouve en γ du groupement OH.

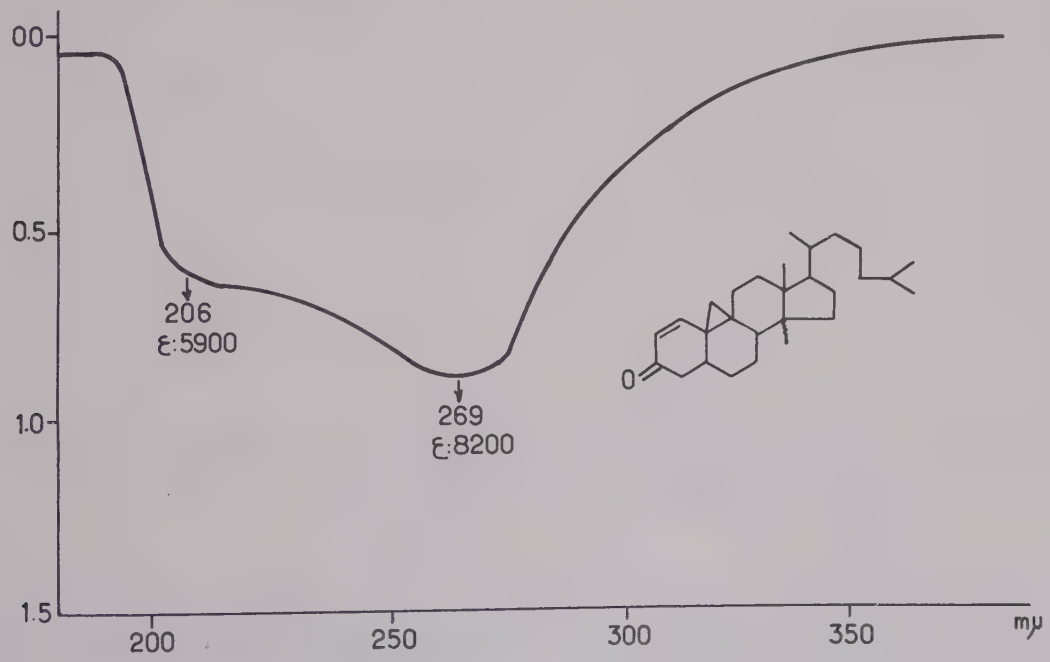


Fig. 11 - Spectre ultra violet de la cétone conjuguée (III).

- Formation de l'éthylène cétal :

Selon la méthode préconisée par DURAZO (1963). Il est connu que les dioxolanes donnent en spectrométrie de masse des coupures caractéristiques (AUDIER 1963) : ces coupures sont induites par la présence d'un substituant en α de la cétone.

Si le méthyle supplémentaire se trouve en 4 (dans le cas d'un stérol ordinaire) nous devons trouver exclusivement un pic à m/e = 99 (a) ; si la position 4 est libre nous avons deux coupures à m/e = 99 et 125 (b) :

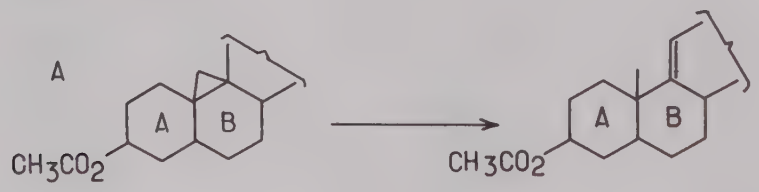
Le spectre de masse de notre cétal présente effectivement un pic très important à m/e = 99 mais aussi un autre très faible à m/e = 125 : il est possible que la présence d'un cycle propanique perturbe légèrement le résultat ; en tout cas celui-ci est trop imprécis pour que nous puissions en déduire la position du méthyle.

III - DERIVES OBTENUS APRES OUVERTURE DU NOYAU CYCLOPROPANE

- Traitement de l'acétate de pollinastanol (V) par HCl gazeux :

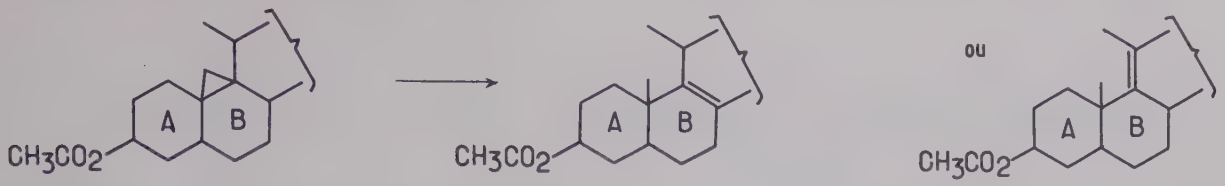
BARTON (1951) a montré que le noyau cyclopropane pouvait s'ouvrir en présence de HCl gazeux avec formation d'une double liaison et apparition d'un méthyle.

Le spectre RMN fait sur l'acétate de pollinastanol auquel nous avons fait subir ce traitement (VI) ne présente plus le système AB provenant des protons cyclopropaniques (spectre RMN 2) ; il y a apparition d'un multiplet à 5,23 ppm correspondant à une double liaison tri substituée. Ceci nous conduit à envisager 2 possibilités pour placer le noyau cyclopropane :



D'autres hypothèses nous amèneraient soit à l'apparition d'une double liaison tétra substituée, soit à l'ouverture du cycle sans apparition d'un méthyle.

Cette observation nous permet d'éliminer la position II pour le méthyle supplémentaire car l'ouverture du cycle propanique se ferait avec apparition d'une double liaison tétra-substituée :



Toujours dans le spectre RMN, l'allure des groupements méthyles est modifiée par rapport au spectre du pollinastanol dans lequel il n'y avait que 3 signaux (correspondant aux 6 méthyles de la molécule) ; dans ce spectre on observe au total 6 signaux ; le signal à 0,67 ppm doit être attribué au méthyle 18 ; le signal à 1,58 ppm n'existait pas dans le spectre du produit initial : il est donc logique de penser qu'il provient du méthyle créé par ouverture du cyclopropane ; toutefois sa position est tout à fait anormale pour un méthyle du type CH -C-C=C. ZURCHER (1963) a observé pour des méthyles 19 de stérols en β de doubles liaisons des déplacements chimiques de l'ordre de 60 à 64 cps (en série 5α). D'autre part dans le spectre du stérol original (spectre RMN 1) les signaux des méthyles se trouvent compris entre 0,65 et 1,08 ppm, il n'y a pas de signal vers 1,60 ppm. Le déplacement chimique anormal du méthyle 19 du produit d'ouverture du cyclopropane est peut être dû à une stéréochimie différente qui placerait le méthyle 19 près du plan de la double liaison, provoquant ainsi le déplacement de son signal vers les faibles champs.

Dans le même spectre on observe des signaux à 2,00 ppm (acétate), 4,70 ppm (CH-acétate).

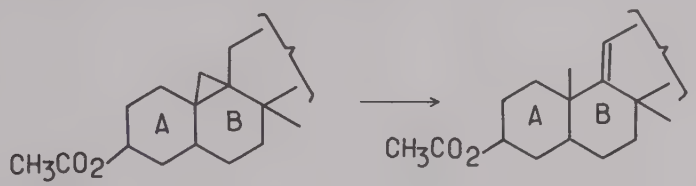
Il est à remarquer que l'on ne constate aucun déplacement anormal de ces signaux, ce qui serait le cas si l'on avait une substitution en 4 (KAWAZOE 1962).

α_D = 0 ($CHCl_3$) ; R_f = 0,8 sur chromatoplaque (pentane : acétate d'éthyle 9:1).

- Essai d'hydrogénation de l'acétate (VI) :

Nous avons essayé d'hydrogéner l'acétate (VI) dans l'acide acétique en présence de PtO_2, mais à notre grande surprise l'huile (VII) que nous obtenons reste insaturée comme nous le montre le spectre de masse : les spectres de masse de ces deux acétates avant et après l'essai d'hydrogénation sont très différents de celui de l'acétate de pollinastanol (V) mais trop peu clairs pour que l'on puisse en déduire quoi que ce soit.

Le spectre RMN de l'acétate (VII) (spectre RMN 3) est fort différent de celui de l'acétate (VI) (spectre RMN 2) : le multiplet à 5,23 ppm a disparu ce qui implique maintenant la nature tétra substituée de la double liaison ; de ceci il découle que le méthyle supplémentaire ne peut se trouver en position 8 ; en effet lors de l'ouverture du cycle propanique nous aurions :



il est impossible à cette double liaison de migrer, elle devrait s'hydrogéner.

Le signal à 1,25 ppm est dû vraisemblablement à une impureté (graisse).

Le signal à 1,58 ppm est absent. Le méthyle en 19 résonne sans doute vers 0,8 - 0,9 ppm ; ce déplacement vers les champs élevés peut s'expliquer par une position relative différente de ce méthyle par rapport à la double liaison (distance un peu plus grande, méthyle au dessus du plan).

Autres pics : 2,02 ppm (acétate) et multiplet vers 4,70 ppm (CH - acétate).

α_D = 0 ($CHCl_3$) ; R_f = 0,9 sur chromatoplaque (pentane : acétate d'éthyle 9:1).

Le fait que cet acétate (VII) ne peut s'hydrogéner et qu'il y ait migration de la double liaison nous permet d'éliminer l'hypothèse B pour la position du noyau cyclopropane : la double liaison qui apparaît en 5-6 est facilement hydrogénable.

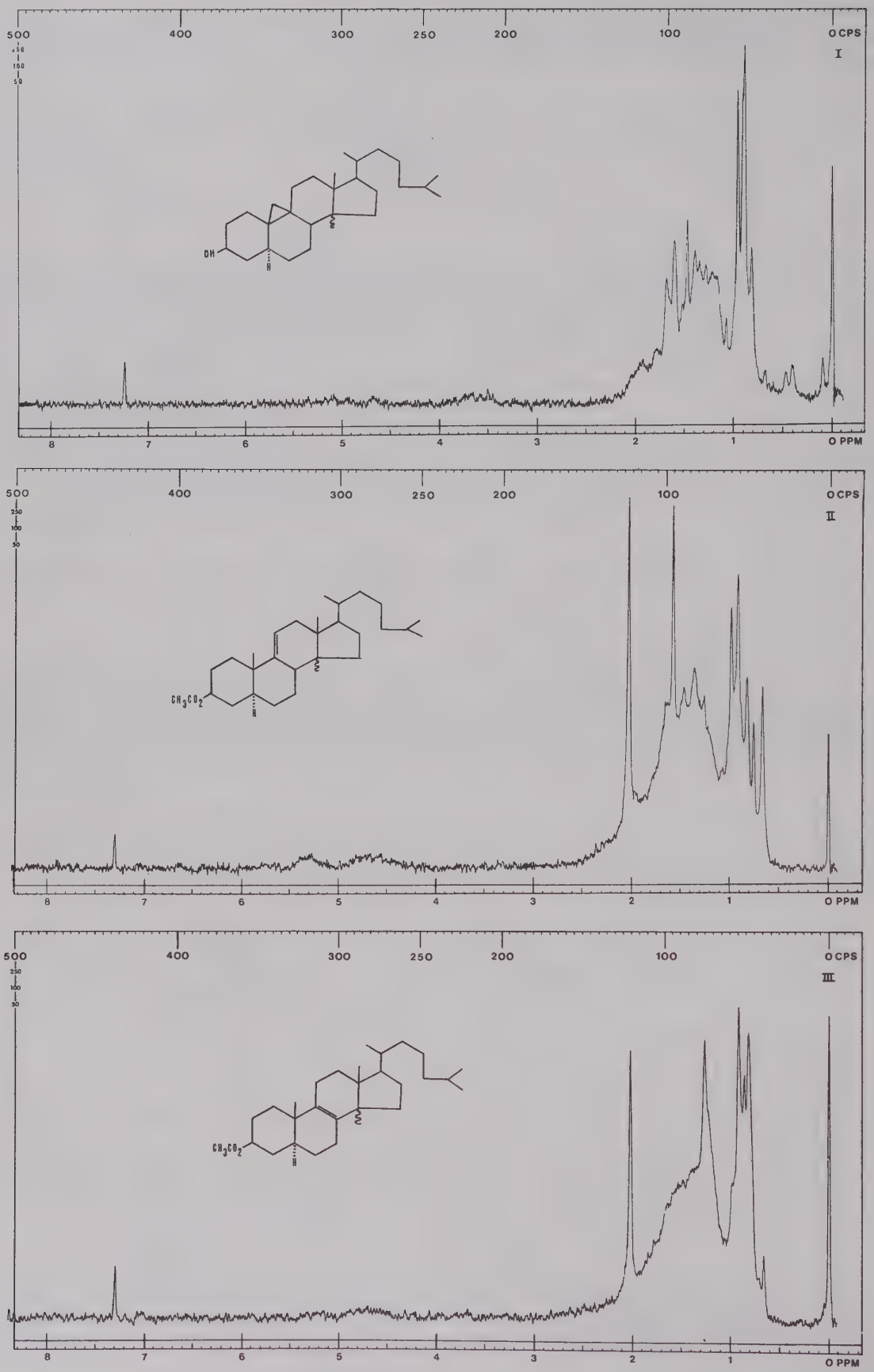
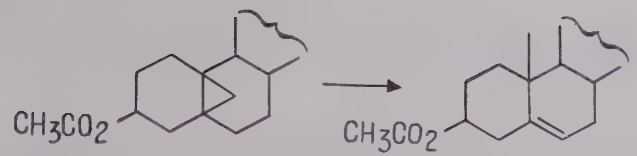


Fig. 12 - Spectres de RMN de :
I - pollinastanol (V) ; II - acétate (VI) ; III - acétate (VII).

B: 

D'après BREAM (1957), dans les conditions où nous avons opéré l'hydrogénation il est possible qu'une double liaison située en 9-10 migre jusqu'en la position 8-9. Cette double liaison tétra substituée ne peut se réduire mais il est possible de la faire migrer jusque dans le cycle D grâce à HCl gazeux (HEILBRON 1932) en une position facilement hydrogénable.

Dans notre cas nous retrouvons le produit qui semble inchangé. Il faut qu'il y ait un empêchement à cette migration qui pourrait provenir d'une substitution en 14. Pour rendre plus probable cette position du méthyle supplémentaire il fallait éliminer définitivement la possibilité d'avoir ce méthyle en 4.

Dans ce but nous avons fait, à partir de la cétone (VIII) deux séries de dérivés possédant des coupures caractéristiques en spectrométrie de masse : un dioxolane et un énol acétate.

- Etude de la cétone (VIII) :

Une oxydation chromique suivie de purifications (chromatographie en phase gazeuse, temps de rétention 13 minutes, puis une chromatographie sur colonne d'alumine) nous a permis de recueillir des cristaux incolores F 138-140°, $\alpha_D = 0$ ($CHCl_3$) ; en chromatographie sur couche mince nous n'avons qu'un produit révélable à la 2,4 dinitro phénylhydrazine (système pentane : acétate d'éthyle 9:1, $R_f = 0,43$).

La 2,4 dinitro phénylhydrazone de cette cétone a comme point de fusion 175-180° et son $R_f = 0,29$ (sur chromatoplaque, dans le même solvant).

a) Dioxolane (IX) :

L'éthylène cétal fait sur la cétone (VIII) est une huile incolore qui en spectrométrie de masse nous montre les coupures à m/e = 99 (112) et 125 que l'on attend d'une cétone en 3, non substituée en 4 (AUDIER 1963).

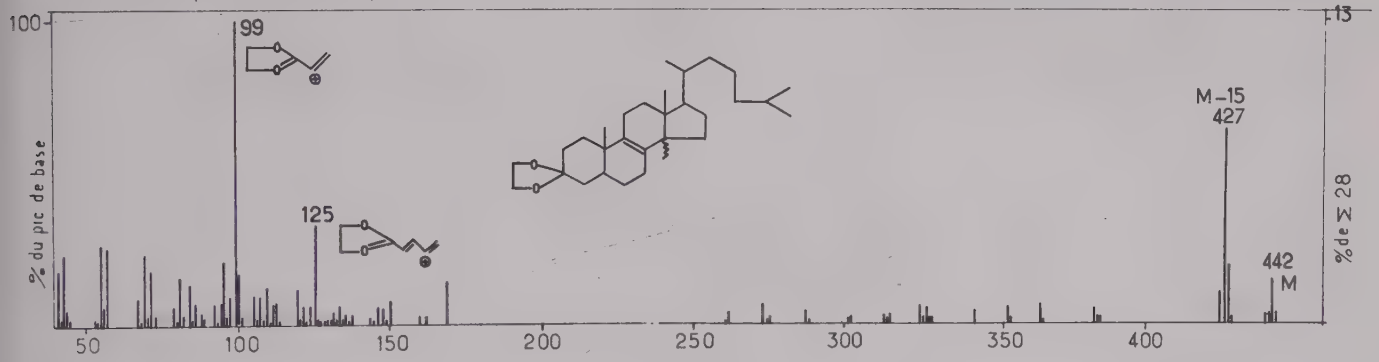
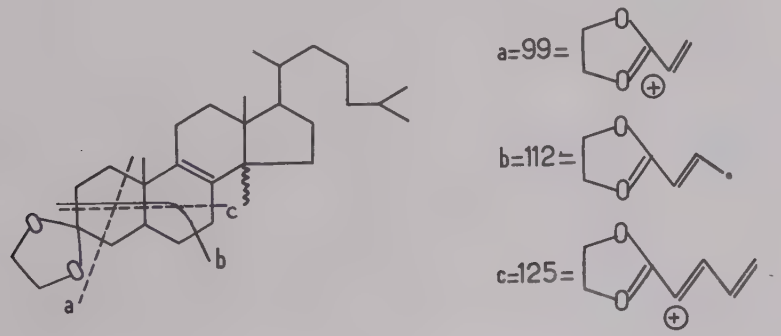


Fig. 13 - Spectre de masse du dioxolane (IX).

Le spectre a été fait en comparaison avec ceux du dioxolane de la 3 cholestanone qui présente ces pics, de l'acide fusidique et de la méthyl 4 cholestanone qui ne donnent que la coupure à m/e=99.

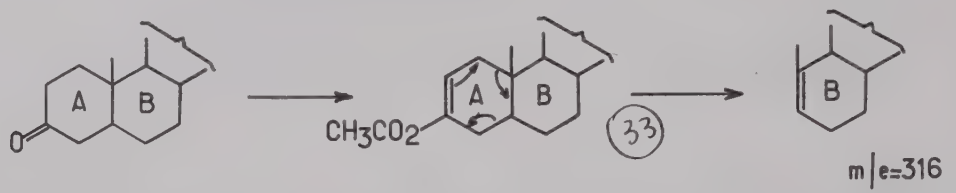


Ceci nous permet d'affirmer que le méthyle supplémentaire ne se trouve pas sur les carbones de 1 à 7. Il reste donc comme possibilité de substitution la position 14 et la position 12 peu vraisemblable du point de vue biogénétique.

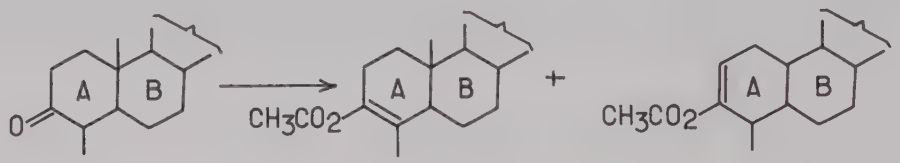
b) Enol-acétate (X) :

Nous avons préparé les énol-acétates de la cétone (VIII), de la cholestanone et de la 4 méthyl cholestanone* (SHOPPEE 1944) et en avons fait là spectrométrie de masse (AUDIER, 1964).

- dans le cas de la cholestanone, on observe un pic très important à m/e = 316 (M-112) dû à un réarrangement selon rétro-Diels du type :

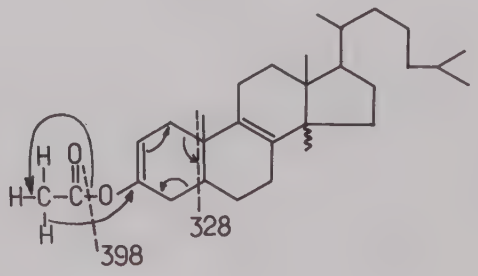


- dans celui de la 4 méthyl cholestanone, l'énolisation se faisant préférentiellement en 3 selon BERKOZ et DJERASSI (1962), il ne peut plus exister de phénomène de rétro-Diels, ou tout au moins il est très faible :



- dans le cas de notre produit nous observons un grand pic à m/e = 328 qui correspond à 316 + 12 (12 = 1 méthyle moins les 2 hydrogènes de la double liaison), ce qui élimine définitivement la possibilité d'une substitution en 4.

On observe aussi une coupure à M - 42 = 398 qui caractérise le départ de céténe et à M - 42 - 15 = 383.



En résumé :

Le pollinastanol possède :

- la même chaîne latérale que le cholestérol,
- un méthyle supplémentaire dans sa partie cyclique,
- un cycle propanique,
- un OH.

- position du OH :

Il est 3β équatorial : d'après le spectre RMN,

parce qu'il forme un digitonide.

---

* Nous remercions le Dr. S. Julia de nous avoir fourni cet échantillon.

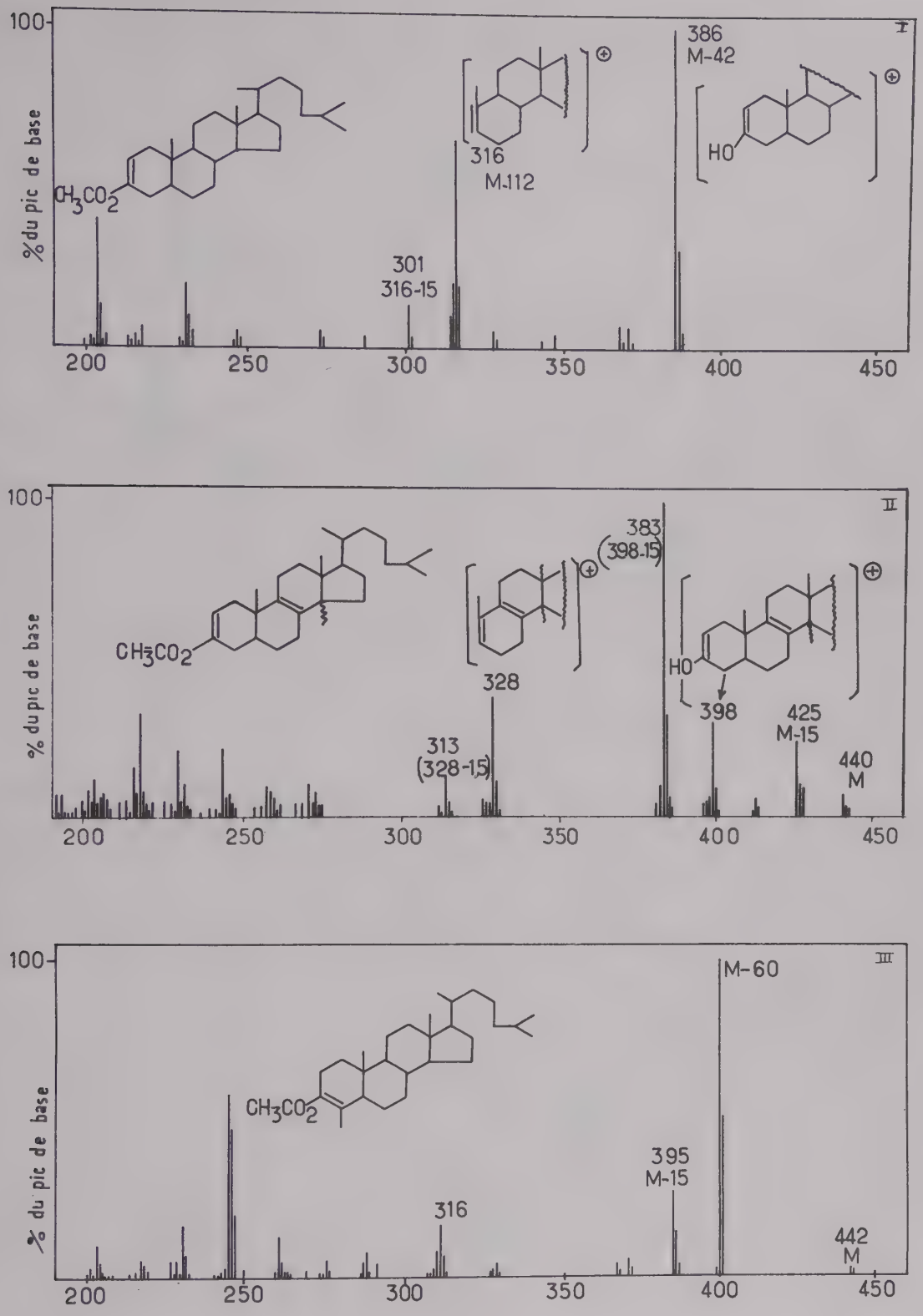
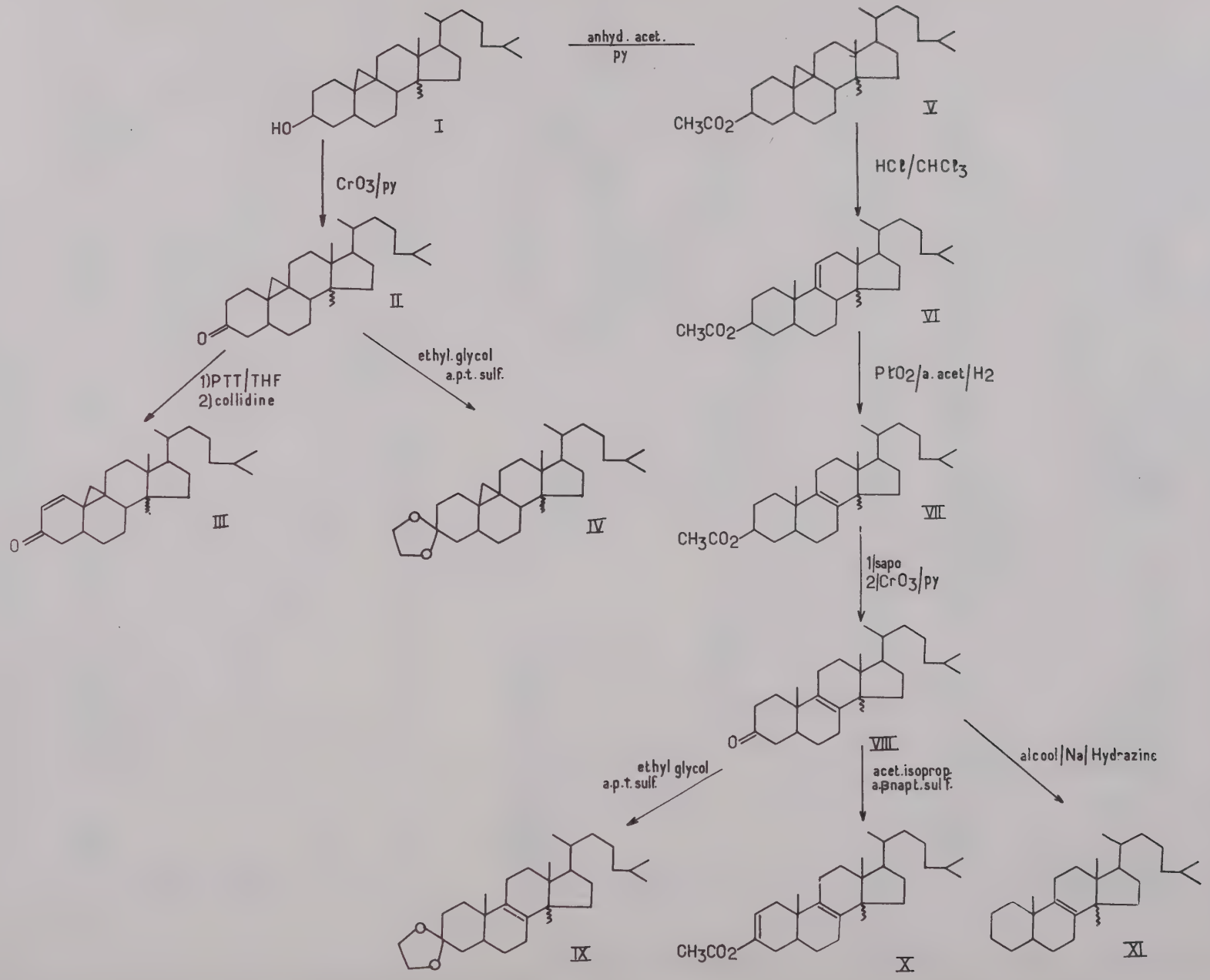


Fig. 14 - Spectres de masse des énols-acétates de :
I - cholestanone ; II - énol-acétate (X) ; III - 4-méthyl cholestanone.

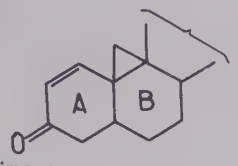

anhyd. acet.
py
HO
I
CrO3/py
II
O
1)PTT/THF
2)collidine
ethyl.glycol
a.p.t. sulf.
III
O
IV
CH3CO2
V
HCl/CHCl3
VI
CH3CO2
PtO2/a. acet/H2
VII
CH3CO2
1/sapo
2/CrO3/py
VIII
O
ethyl glycol
a.p.t. sulf.
acet.isoprop.
a.βnapt.sulf.
alcool/Na/Hydrazine
IX
X
CH3CO2
XI

- Position du cycle propanique :

Il ne peut être qu'en 19-10 car :

- il s'ouvre en donnant un méthyle supplémentaire en β d'une double liaison tri substituée qui ne s'hydrogène pas mais migre en une position tétra substituée.

- il donne un système conjugué du type



- Position du méthyle supplémentaire :

- nous avons éliminé la position 4, en faisant un énol-acétate et un dioxolane qui donnent les coupures caractéristiques des cétones non substituées en 4.

- le même dioxolane nous permet d'affirmer qu'il n'y a pas de substituants sur les carbones 1 à 7.

- nous avons rejeté la position 8 : la double liaison tri substituée ne peut migrer et devenir tétra substituée.

- nous n'avons pas retenu la possibilité de la position II car l'ouverture du cycle propanique nous conduit directement à une double liaison tétra substituée.

- le méthyle ne peut se trouver dans la chaîne latérale d'après les résultats de la spectrométrie de masse.

- les positions 12, 15 et 16 nous semblent difficilement acceptables du point de vue biogénétique.

- il nous semble vraisemblable que le méthyle se trouve en 14 :

. à cause des résultats précédents,

. parce que la double liaison ne se réduit toujours pas après un essai de migration,

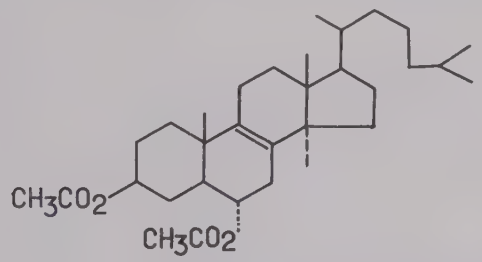
. parce que la position du méthyle, s'il est sur ce carbone peut gêner cette migration.

- Configuration des cycles A et B :

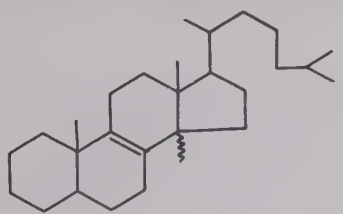
De part les résultats du dichroïsme circulaire nous savons que nous avons à faire à un alcool de la série 5α donc que la jonction des cycles est trans.

Nous avons essayé d'éclairer cette structure en préparant un dérivé que nous pourrions comparer à une substance de structure connue.

Ayant à notre disposition un échantillon d'acétate de macdougalline* :



Nous avons préparé la dicétone correspondante puis nous l'avons réduite selon la méthode de Huang - Minlon modifié par SHOPPEE (1944) de façon à obtenir l'hydrocarbure suivant :



---

* Nous remerçions le Dr. C. Djerassi qui nous a fourni cet échantillon.

La cétone (VII) réduite devrait donner le même hydrocarbure si sa configuration était la même que celle de la macdougalline (DJERASSI 1963).

Nous avons obtenu, dans les deux cas, une huile que nous avons purifiée sur colonne d'alumine.

Dans les deux cas le spectre de masse nous montre que nous avons bien à faire à l'hydrocarbure cherché (M = 384) ; il existe une coupure importante à m/e = 369 (perte d'un méthyle) ; il n'y a pas d'autres coupures caractéristiques ; on retrouve un peu d'acétate de départ mais le spectre correspondant à la macdougalline réduite est extrêmement confus.

Les spectres infrarouge des deux dérivés sont semblables (faits dans le tétrachlorure on ne peut trouver traces des bandes acétates).

Les pouvoirs rotatoires faits dans $CHCl_3$ sont respectivement :

- 40 pour la macdougalline réduite,
- 35 pour la cétone (VIII) réduite.

Sur chromatoplaque, nous avons pu voir, après révélation à l'acide sulfurique, que ces deux carbures avaient le même R_f = 0,3 (hexane-acétate d'éthyle 9:1) ; on trouve aussi des traces d'acétates et dans le cas de la macdougalline un peu de produit ne migrant pas.

Une chromatographie en phase gazeuse n'a pu nous renseigner davantage : l'hydrocarbure (XI) a un temps de rétention de 10 minutes qui semble normal par rapport à celui du cholestane (9 minutes), mais le diagramme de l'hydrocarbure obtenu par réduction de la macdougalline est inutilisable, le produit est trop impur.

Il semble donc, à l'heure actuelle, que le pollinastanol ait toutes les chances d'avoir la structure I, sans pour cela que nous puissions l'affirmer tant que nous n'en aurons pas isolé de plus grandes quantités.

PARTIE EXPERIMENTALE

I - ANALYSE DU STEROL NON SAPONIFIE

a) Chromatographie de partage sur acide silicique :

10 g d'extrait sont filtrés sur une colonne de 150 g d'acide silicique contenant 150 cm^3 d'eau. Les solvants sont saturés d'eau et les élutions de 100 cm^3 :

1	Chloroforme	371 mg
2	"	37
3	"	10
4	"	8
5	Chloroforme-méthanol 95:5	13
6	"	81
7	"	11
8	Chloroforme-méthanol 9:1	9
9	Chloroforme-méthanol 4:1	26
10	"	23
11	"	27
12	"	26
13	Chloroforme-méthanol 1:1	160
14	"	599
15	"	905

16	Chloroforme-méthanol 1:1	735
17	"	888
18	Méthanol	1 253
19	"	850
20	"	901
21	"	971

Les fractions 1-2 (ayant une réaction de Liebermann positive) ont été chromatographiées sur 5 g d'acide silicique ; élutions de 500 cm^3 :

1	éther de pétrole	232
2	"	0
3	éther de pétrole-benzène 9:1	7
4	éther de pétrole-benzène 4:1	36
5	"	9
6	"	6
7	éther de pétrole-benzène 1:1	38
8	"	22
9-10	"	23
11	benzène	40
12	"	16
13-14	benzène-éther 9:1	77
15-16	benzène-éther 4:1	31
17-18	benzène-éther 1:1	23
19	éther	4
20	éther-méthanol 4:1	0

Les fractions 3-4-5 ont un test de Liebermann positif ainsi que les fractions 10 - 11 - 12. En faisant des chromatoplaques de ces deux groupes nous avons pu voir que 3-4-5 contenaient des esters de stérols tandis que 10-11-12 ne contenaient que des stérols. Les spectres RMN montrent la présence d'un cycle propanique dans 3-4-5 tandis que 10-11-12 n'en contiennent pas.

- saponification de 3-4-5 :

Cette fraction après être restée 2 heures à reflux avec 5 cm^3 de potasse méthanolique (2N) donne 19 mg d'une substance ayant une réaction de Liebermann positive. Le spectre RMN montre la présence du cycle propanique dans ce stérol.

b) Chromatographie d'absorption sur acide silicique :

7,5 g d'extrait sont filtrés sur 45 g d'acide silicique :

1-2	30 cm^3	benzène	0
3	"	"	277 mg
4	"	"	269
5	"	"	159
6	"	benzène-éther 95:5	38
7	"	"	161
8	"	benzène-éther 9:1	182
9	"	"	40

10-11	30 cm³	benzène-éther 9:1	43
12	20 cm³	benzène-éther 4:1	1 943
13	"	"	140
14	10 cm³	"	118
15	30 cm³	benzène-éther 1:1	234
16	"	"	98
17-18	"	éther	180
19-20	"	"	236
21		éther-méthanol 4:1	0

Les fractions 3-4-5 sont des esters de stérols qui ont un cycle propanique dans leur squelette.

- saponification des fractions 3-4-5 :

50 mg sont mis à reflux 3 heures avec 50 cm³ de potasse méthanolique (2N) : la fraction insaponifiable à une réaction de Liebermann positive et présente toujours les bandes cyclopropaniques dans le spectre RMN.

- fractions 12-13-14 :

Elles ont une réaction de Liebermann positive, F 138-140°, α_D = - 39 ($CHCl_3$) ; l'acétate (10 mg/1 cm³ de pyridine et 0,9 cm³ d'anhydride acétique, 1 nuit à 37°) fond vers 133°. Le stérol obtenu est identique à celui F 142-143°.

Ces fractions n'ont pas laissé déposer dans les eaux-mères de stérols F 95°.

II - ANALYSE DE L'EXTRAIT SAPONIFIE

Nous obtenons le stérol (I) F 95° dans les eaux-mères de cristallisation du stérol F 142-143° (voir saponification et chromatographie chapitre III p. 33).

Une chromatoplaque de contrôle (système pentane-acétate d'éthyle 9:1) ne montre qu'une tache après révélation au $SbCl_3$ (coloration rouge) de R_f identique à celui du cholestérol, α_D = + 41 (CHCl).

a) Acétate de pollinastanol (V) :

20 mg dans 1 cm³ de pyridine et 0,8 cm³ d'anhydride acétique sont laissés une nuit en contact à 37° ; après extraction nous obtenons une huile incolore qui refuse de cristalliser, α_D = + 29 ($CHCl_3$). Une chromatoplaque de contrôle (pentane : acétate d'éthyle 4:1) ne présente qu'une tache de même R_f que l'acétate de cholestérol (révélation $SbCl_3$).

- ozonisation de l'acétate :

20 mg sont dissous dans 5 cm³ d'acide acétique et l'ozonisation est faite dans les mêmes conditions que celles employées pour l'obtention du 24 céto cholestérol (chapitre III p. 33) ; nous avons retrouvé le produit inchangé (confirmé par la spectrométrie de masse, la chaîne est saturée).

b) Pollinastanone (II) et dérivés :

40 mg de pollinastanol sont mis à oxyder dans 0,5 cm³ de pyridine, une nuit à température ordinaire, avec 20 mg de CrO_3 dissous dans 0,5 cm³ de pyridine. Après extraction à l'eau et à l'éther on obtient 30 mg d'une huile transparente.

- bromuration-déshydrobromydration (III) :

- on dissout 15 mg dans 0,8 cm³ de tétrahydrofurane sec : on ajoute 15 mg de tribromure de phényltriméthylammonium (PTT) dans 0,5 cm³ de THF ; on observe un précipité blanc et une décoloration de la solution. On laisse une nuit à température ordinaire et l'on extrait par du carbonate à 5 % et de l'éther ; on obtient 19 mg de produit bromé.

- on met 2 heures à reflux ces 19 mg dans 1,5 cm³ de collidine symétrique ; on abandonne 3 jours à température ordinaire. Après extraction par l'éther on obtient 16 mg que l'on chromatographie sur 3 g d'alumine, les élutions sont de 5 cm³ :

1-2	éther de pétrole	0
3-4	éther de pétrole-benzène 9:1	0
5-6	éther de pétrole-benzène 4:1	0
7-8	éther de pétrole-benzène 1:1	9 mg
9-10	"	5
11-12	benzène	0
13-14	benzène-éther 1:1	3
15-16	éther	0

Les fractions 13-14 présentent 2 maximums en ultra-violet à 206 et 269 mμ, les ε sont de 5 900 et 8 200.

- dioxolane (IV) :

3 mg de cétone (II) sont dissous dans 2 cm^3 de benzène anhydre, on y ajoute 0,1 cm^3 d'éthylène glycol et 8 mg d'acide para toluène sulfonique. On met l'ensemble dans un appareil de Dean et Stark et on laisse 20 heures à reflux. On lave ensuite au carbonate et à l'eau : on obtient une huile.

c) Obtention de l'acétate (VI) et de ses dérivés :

- action de HCl gazeux :

Afin d'obtenir l'ouverture du cycle propanique, on dissout 35 mg d'acétate de pollinastanol (V) dans 10 cm^3 de chloroforme ; on fait passer HCl gazeux durant 45 minutes ; on amène à sec. Le spectre ultra-violet fait dans l'alcool montre une absorption à 215 mμ. Il y a apparition d'un méthyle supplémentaire et d'une double liaison tri substituée dans le spectre RMN et disparition des bandes caractéristiques du noyau cyclopropane.

- essai d'hydrogénation :

a) dans l'acide acétique en présence de PtO_2, 2 fois 2 heures (10 mg/10 cm^3 + 10 mg de catalyseur).

b) dans l'éther en présence de Pd, 4 heures (10 mg/4 cm^3 + 10 mg de catalyseur).

Le produit (VII) reste insaturé, mais la double liaison est maintenant tétra substituée.

- action de HCl gazeux à froid :

Les 10 mg sont dissous dans 2 cm^3 de $CHCl_3$. On laisse passer HCl gazeux 4 heures à 0°, on évapore à sec. Ceci devait permettre à la double liaison de migrer en position hydrogénable.

- essai d'hydrogénation :

Le produit récupéré de cet essai est dissous dans 1 cm^3 d'acide acétique, on y ajoute 10 mg de PtO_2 et on laisse sous hydrogène 5 heures : l'acétate récupéré reste, apparemment, inchangé.

d) Préparation de la cétone (VIII) et de ses dérivés :

- saponification de l'acétate (VII) :

65 mg de cet acétate sont mis à reflux avec 2 cm^3 de potasse méthanolique (2N) durant 2 heures. On obtient 60 mg de stérol.

- oxydation chromique :

Ces 60 mg sont dissous dans 2 cm^3 de pyridine, on ajoute 30 mg de CrO_3 en solution dans 1 cm^3; on abandonne 16 heures à température ordinaire. On obtient 45 mg de produit après extraction.

- purification de la cétone (VIII) :

Par chromatographie en phase gazeuse sur colonne de chromosorb W contenant 4 % de SE 30. La colonne avait 2 m de long, 4 mm de diamètre. La température du four était 240°, la température à l'entrée 280°, celle à la sortie 260° ; le débit d'hélium était 60,6 $cm^3/'$ et la vitesse d'enregistrement 0,125 mm/". Nous n'avons obtenu qu'un seul pic dont le temps de rétention est de 13 minutes.

Nous avons recueilli cette cétone et l'avons filtrée sur colonne d'alumine : avec un mélange benzène-éther 1 % on recueille un produit que l'on cristallise dans le méthanol ; F 138-140°, α_D = 0 ($CHCl_3$).

En chromatographie sur couche mince nous n'avons qu'une tache révélable à la 2,4 dinitro phénylhydrazine (R_f = 0,43, système pentane-acétate d'éthyle 9:1).

- préparation de la 2,4 dinitro phénylhydrazone :

Nous avons fait une chromatographie préparative de la cétone (VIII). Après révélation à la 2,4 dinitro phénylhydrazine nous avons recueilli le dérivé formé sur plaque, nous l'avons extrait à l'éther, et cristallisé dans le méthanol F 175-180°. R_f dans le même système sur chromatoplaque de contrôle = 0,29.

- préparation du dioxolane (IX) :

15 mg sont dissous dans 2 cm^3 de benzène anhydre. On y ajoute 0,15 cm^3 d'éthylène glycol et 8 mg d'acide para toulène sulfonique. On laisse 20 heures à reflux dans un appareil de Dean et Stark. On extrait ensuite à l'éther et lave au carbonate et à l'eau.

Nous avons préparé de la même manière le dioxolane de la cholestanone et de la 4 méthyl-cholestanone.

- préparation de l'énol acétate (X) :

5 mg de la cétone (VIII) sont mis à reflux 9 heures avec 2 cm^3 d'acétate d'isopropylidène et une trace d'acide β-naphtalène sulfonique. On extrait à l'éther et lave à l'eau. Par chromatographie sur alumine on récupère au mélange éther de pétrole-benzène (1:1) 3 mg d'énol acétate.

On prépare de même l'énol acétate de la cholestanone et de la 4 méthylcholestanone.

- préparation de l'hydrocarbure (XI) :

On ajoute à 7 mg de la cétone 0,3 cm^3 d'hydrate d'hydrazine et 2 cm^3 d'alcool absolu contenant 50 mg de sodium. On met en tube scellé une nuit à 180°. On extrait à l'éther et lave à l'eau.

On filtre sur alumine et recueille une huile transparente avec l'éther de pétrole, α_D = -35 ($CHCl_3$).

Nous avons fait la même réduction sur l'acétate de macdougalline (après saponification et oxydation chromique par CrO_3 dans l'eau et l'acide acétique) ; nous obtenons, dans ce cas, une huile que l'on recueille après filtration sur colonne d'alumine avec l'éther de pétrole, α_D = - 40 ($CHCl_3$).

On trouve en plus d'une tache très légère correspondant à l'hydrocarbure (R_f = 0,29, système hexane-acétate d'éthyle 9:1, révélation à l'acide sulfurique à 50 %) des taches dues à l'acétate non réduit et à un produit ne migrant pas.

Nous avons fait une chromatographie en phase gazeuse dans les conditions suivantes : colonne de 2 m remplie de Chromosorb W (acide) à 10 % de silicone SE 30 ; température d'entrée 315°, température de sortie 305°, température du four 270°, débit d'azote 50 cm^3/', vitesse d'enregistrement 2,5 cm/'.

Ainsi le cholestane (obtenu par réduction de la cholestanone) a un temps de rétention de 9 minutes, l'hydrocarbure (XI) de 10 minutes (possédant un méthyle et une double liaison de plus son temps de rétention peut être considéré comme correct), mais l'hydrocarbure obtenu à partir de la macdougalline est très impur : il existe un pic au même niveau que celui de l'hydrocarbure (XI) mais de très faible intensité, les pics les plus importants se situent au début du chromatogramme.

e) Réaction d'Oppenauer :

Faite sur 10 mg de pollinastanol dans les mêmes conditions que pour le stérol F 142-143° (chapitre III p. 34) ; le produit reste inchangé : il n'y a pas d'absorption en ultraviolet.

f) Formation d'un digitonide :

2 mg de pollinastanol sont dissous dans 1 cm^3 d'alcool à 90°. On y ajoute 7 mg de digitonine dans 2 cm^3 d'alcool à 90°. On porte à l'ébullition durant 1 minute de façon à ce que tout soit dissous. On obtient à froid un précipité blanc de digitonide.

III - PREPARATION DE I-STEROLS

a) i-cholestérol :

- préparation du tosylate :

300 mg de cholestérol et 300 mg de chlorure de tosyle sont dissous dans 3,5 cm^3 de pyridine anhydre : on laisse 16 heures à température ordinaire ; on reprend par l'eau et l'éther et après avoir amené à sec la phase éthérée on obtient 500 mg de cristaux jaunâtres.

- préparation de l'i-cholestérol acétate :

On verse une suspension de 1,4 g d'acétate de potassium dans 21 cm^3 d'anhydride acétique sur le tosylate, on laisse 48 heures à 70°. On verse dans l'eau et on extrait par l'éther, on lave au carbonate et à l'eau : on récupère ainsi 371 mg d'acétate.

- saponification et purification :

On porte cet acétate 30 minutes à reflux avec 4 cm^3 d'alcool à 95°, 1 cm^3 d'eau et 300 mg de potasse ; après avoir extrait, on chromatographie sur 15 g d'alumine, les élutions sont de 20 cm^3 :

1-2	éther de pétrole	17 mg
3	éther de pétrole-benzène 95:5	0
4	éther de pétrole-benzène 9:1	0
5	éther de pétrole-benzène 4:1	0
6	éther de pétrole-benzène 1:1	9
7	"	39
8	"	26
9	"	19
10	"	9
11	"	8
12	"	3
13-14	benzène	3
15	benzène-éther 9:1	0
16-17	benzène-éther 4:1	77
18	benzène-éther 1:1	} 15
19	éther	
20	éther-méthanol 4:1	

Les fractions 7-8-9 sont cristallisées dans l'éthanol F 72-75°, α_D = + 50 ($CHCl_3$) (littérature F 75°, α_D = + 25°). Elles présentent les bandes cyclopropaniques en RMN.

b) i-stérol à partir du stérol F 142-143° :

- tosylate :

A partir de 100 mg de stérol, 100 mg de chlorure de tosyle dans 1 cm^3 de pyridine ; nous avons obtenu 60 mg de tosylate F 106-107°, α_D = - 55 ($CHCl_3$).

- obtention du i-stérol méthylé :

Nous avons dissous ces 60 mg dans 3,3 cm^3 de méthanol distillé sur calcium. Nous avons ajouté 80 mg d'acétate de potassium fondu et laissé 4 heures à reflux. Après avoir amené à sec nous avons extrait par de l'éther et chromatographié le produit obtenu (45 mg) sur 3 g d'alumine, les élutions sont de 5 cm^3 :

1	éther de pétrole	traces
2	"	20 mg
3-4	"	13

5	éther de pétrole	0
6-7	éther de pétrole-benzène 95:5	0
8-9	éther de pétrole-benzène 1:1	0
10	benzène	0
11	éther	0

Ces i-stérols méthylés ne cristallisent pas, $\alpha_D = +30$ ($CHCl_3$).

Le tosylate de ces stérols étant insoluble dans l'anhydride acétique, force nous a été de préparer les dérivés méthylés.

BIBLIOGRAPHIE

AUDIER H., DIARA A., DURAZO M., FETIZON M., FOY P., VETTER W., 1963 - Orientation de la fragmentation en spectrométrie de masse par l'introduction de groupements fonctionnels II. Bull. Soc. Chim. France, 2827-2830.

AUDIER H., FETIZON M., VETTER W., 1964 - Orientation de la fragmentation en spectrométrie de masse par introduction de groupements fonctionnels III. Bull. Soc. Chim. France, 415-418.

BARTON D. H. R., 1951 - Triterpenoids, part III, cyclo artenone, a triterpenoid Ketone. J. Chem. Soc., 1444-1451.

BENTLEY H. R., HENRY J. A., SPING F. S., IRVINE D. S., 1963 - Triterpene resinols and related acids, part XXVIII, the structure of cyclo artenol. J. Chem. Soc., 3673.

BENTLEY H. R., HENRY J. A., IRVINE D. S., MUKERJI D., SPRING F. S., 1955 - Triterpenoids, XXXII, cyclolaudenol a triterpenoid alcohol from opium. J. Chem. Soc., 596-602.

BERKOZ B., CHAVEZ E. P., DJERASSI C., 1962 - Steroids part CLXXII, factors controlling the direction of enol acetylation of 3-oxosteroids. J. Chem. Soc., 1323-1329.

BREAM J. B., EATON D. C., HENBEST H. B., 1957 - Aspect of stereochemistry, Part IV. J. Chem. Soc., 1974-1981.

COX J. S., KING F. E., KING T. J., 1956 - The chemistry of extractives from Hardwoods, part XXVI. J. Chem. Soc., 1384-1392.

COX J. S., KING F. E., KING T. J., 1957 - The structure of cycloeucalenol. Proc. Chem. Soc., 290.

COX J. S., KING F. E., KING T. J., 1959 - The structure of the cycloeucalenol. J. Chem. Soc., 514-518.

DJERASSI C., KNIGHT J. C., WILKINSON D. I., 1963 - The structure of the cactus sterol magdougallin. J. Am. Chem. Soc., *85*, 835.

DURAZO M., 1963 - Contribution à la spectrométrie de masse des stéroïdes. Thèse (Paris).

HEILBRON I. M., WILKINSON D. G., 1932 - Studies on the sterol group, part XIV.. J. Chem. Soc., 1708-1714.

IRVINE D. S., HENRY J. A., SPRING F. S., 1955 - Triterpenoids part XXXIII. The constitution of cycloartenol. J. Chem. Soc., 1316-1320.

KAWAZOE Y., SATO Y., NATSUME M., HASAGAWA H., OKAMOTO T., TSUDA K., 1962 - Application of NMR to stereochemistry. Chem. Pharm. Bull., *10*, 338-344.

LIEBERMANN S., 1948 - Studies in steroid metabolism V. J. Am. Chem. Soc., *70*, 1427-1432.

LIEBERMANN S., 1954 - Hydrolysis of urinary Ketosteroid conjugates. Recent progress in Hormon Research, *9*, 113-134.

MAC KENNA J., NORYMBERSKI J.K., 1957 - Steroid sulphates part II.. J. Chem. Soc., 3893-3900.

MARQUET A., 1961 - Halogénations sélectives par les perhalogénures d'ammonium quaternaire. Thèse (Paris).

MASON M., 1963 - Optical rotatory power. Quarterly Reviews, *17*, 20-66.

MUSCHER J. I., 1961 - The nuclear magnetic resonance spectra of the 10-methyldecalols 2. J. Am. Chem. Soc., *83*, 1146-1151.

PESEZ M., POIRIER P., 1954 - Méthodes de recherche en chimie organique, vol. II, p. 220 (Masson Paris).

POOS G. I., ARTH G. E., BEYLER R. E., SARETT L. H., 1953 - Approaches to the total synthesis of adrenal steroids V. J. Am. Chem. Soc., *75*, 422-429.

SHOPPEE C., 1944 - Die Umlagerung von 17 oxy 20 keto Steroiden V. Helv. Chim. Acta, *27*, 8-23.

STEELE J. A., MOSETTIG E., 1963 - The solvolys 16 of stigmasteryl tosylate. J. Org. Chem., , 571-572.

WITZ P., HERMANN H., LEHN J. M., OURISSON G., 1963 - Etude des cétones cycliques XIII, dichroïsme circulaire de cétones stéroïdes et triterpéniques. Bull. Soc. Chim. France, 1101-1112.

ZURCHER R. F., 1963 - Protonen Resonanzspektroskopie und Steroidstruktur. Helv. Chim. Acta, *46*, 2054-2088.

CHAPITRE VIII

ETUDE DES ACIDES DU POLLEN DE ZEA MAYS

L'étude des acides de *Zea mays* nous a permis de dresser le tableau 9.

Nous avons effectué ce travail sur des pollens de provenances diverses et nous avons utilisé des techniques d'extraction et de séparation différentes.

I - Sur un pollen ramassé par les abeilles (pollen dont nous disposions d'assez grandes quantités) nous avons fait une extraction à l'éther puis à l'alcool.

De ces deux extraits, ont été isolés les acides libres, grâce au carbonate de sodium, puis les acides liés que l'on obtient après saponification.

- sur une partie de l'extrait alcoolique nous avons fait une chromatographie d'adsorption sur acide silicique, chromatographie qui devait permettre de séparer les acides monocarboxyliques d'éventuels acides dicarboxyliques : ces derniers ne semblent pas s'y rencontrer.

Nous avons filtré une autre partie sur charbon Darco, afin d'éliminer la présence d'acides aromatiques.

Enfin nous avons bromé une troisième partie, nous avons pu ainsi nous rendre compte que se trouvait présent un acide insaturé en C_{18}.

Ces différentes fractions, ainsi que l'extrait brut ont été méthylés selon la méthode de WERNER (1919) avant d'être injectés dans un chromatographe en phase gazeuse.

- nous avons distillé une partie de l'extrait éthéré, dans un tube à boules ; mais cette distillation ne nous a pas permis d'isoler d'acides purs.

- nous avons filtré une autre partie sur Darco et bromé la troisième partie sans beaucoup plus de résultats que dans l'extrait alcoolique.

La majorité de la fraction acide des deux extraits (alcoolique et éthérée) est composée d'acides monocarboxyliques. On y trouve aussi de la nipagine (ester méthylique de l'acide para hydroxy benzoïque) et de l'acide 10-hydroxy décénoïque.

II - Sur un pollen ramassé à la main (donc que nous avions en faibles quantités), nous avons uniquement fait un extrait acétonique ; nous l'avons fractionné en acides libres par le carbonate et acides liés que nous avons libérés par saponification. Les résultats sont identiques à ceux obtenus sur le pollen ramassé par les abeilles mais nous ne trouvons plus trace ni de nipagine ni d'acide 10-hydroxy décénoïque : ces deux produits proviennent vraisemblablement d'une contamination par la salive des ouvrières, au moment de la fabrication des pelottes ; on les rencontre dans les glandes mandibulaires en quantité appréciable (PAIN, HUGEL et BARBIER 1960).

Tableau 9

	I																							II	
	extrait alcoolique																extrait éthéré							extrait acétonique	
	a. de saponification											a. libres					a. de saponification						a. libres	a. sapo.	a. libres
	chromatographie											bruts			bruts			bruts		distil.			bruts	bruts	
	V_r	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		D	B		D	B		D	B	1	2	3			
acides mono-carboxyliques																											
C_{10}	0,8			1,1	1	1										1,1						1,2			1,7	1,6	
C_{12}	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,8	1,8	1,7	1,9	1,6	1,7	1,8	1,7	1,6	1,7							
C_{14}	3,4		3,5	3,6	3,5	3,6	3,6		3,5				3,5	3,7	3,5	3,5	3,6	3,5	3,5	3,7	3,6	3,6				3,5	
C_{15}	5,5															5,5			5,2			5,4					
C_{16}	8,1	8,0	8,2	8,1	8,2	8,0	8,2		8,0				8,0	8,2	8,0	8,2	8,1	8,0	8,1	8,3	8,0	8,1	8,0	8,1		8,1	8,1
C_{17}	11,4		11,6	11,3	11,5											11,9										11,9	
C_{18}	17,5		17,7	17,5	17,5	17,7							17,4	17,6	17,3	17,6	17,7	17,4	17,5	17,3	17,4		17,5	17,7		17,5	17,5
C_{19}	22,5																										
C_{20}	37,4																										
a. linoléique	20,3		20,1																								
a. 10 hydroxy-décénoïque	4,2												4,2									4					
nipagine	2												2														
a. du pollen non identifiés																2,5									2,5		
																5,5								7,74			
													21,2	21,7										21,2			
																23,2									23,3		
																								31,7			
																									35,4		

I = pollen ramassé par les abeilles
D = passage sur Darco

II = pollen ramassé à la main
B = bromés

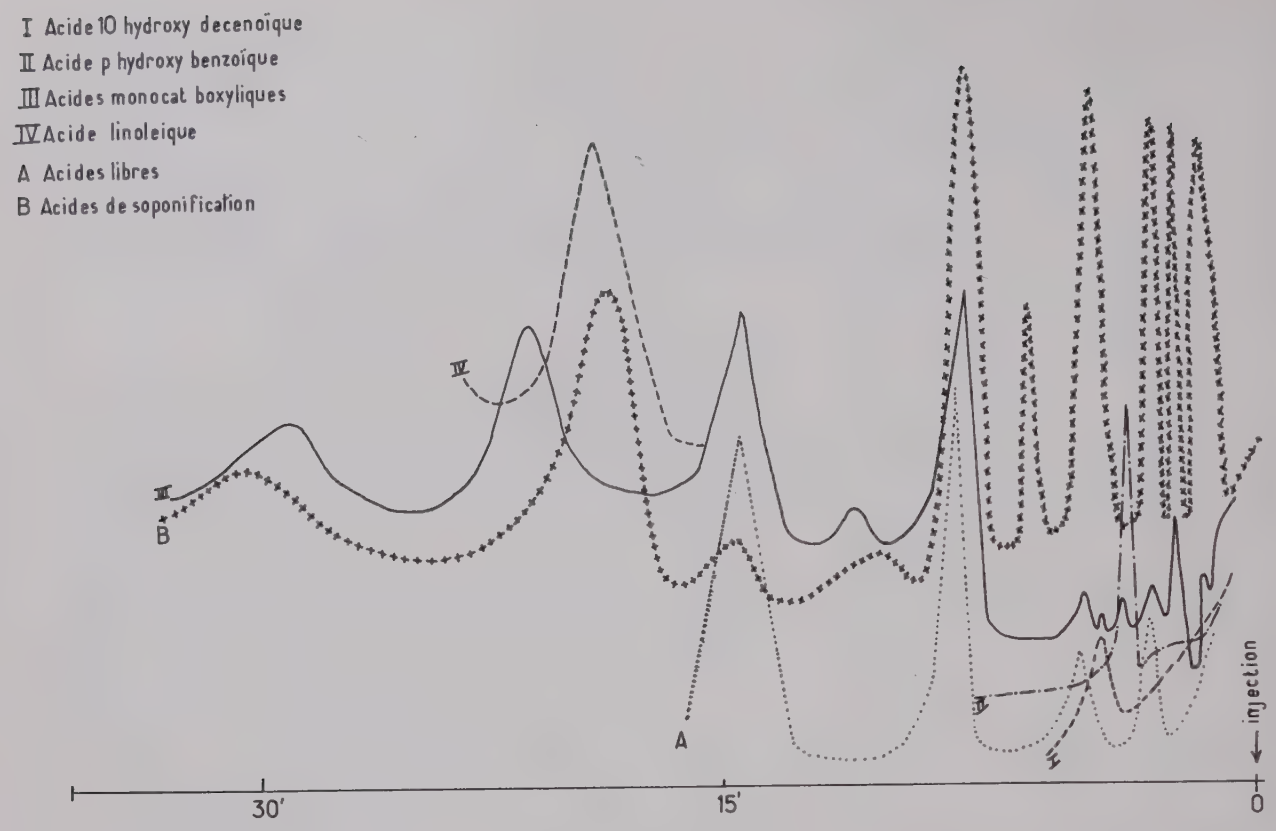


Fig. 15 - Chromatogrammes des esters méthyliques des acides du pollen de *Zea mays* : Argon Pye Chromatograph chromosorb P 5 % de silicone, 200°, 1250 volts, sensibilité 10, argon : 31 mm^3/minute, vitesse d'enregistrement : 18 inches/heure.

PARTIE EXPERIMENTALE

A - POLLEN RAMASSE PAR LES ABEILLES

I - EXTRAIT ETHERE

Il est obtenu par épuisement du pollen par l'éther à température ordinaire. Il représente 3,5 % du poids du pollen.

a) Acides libres :

Cet extrait repris par le carbonate nous a donné, après acidification de la phase aqueuse, une cire brune qui représente 10 % en poids de l'extrait total. Cette gomme contient les acides libres ; ceux-ci après méthylation par le diazométhane selon la méthode de WERNER (1919) ont été injectés dans un chromatographe en phase gazeuse.

Une partie de ces acides a été bromée afin de déceler la présence d'acides insaturés (brome dans le tétra chlorure) ; une autre partie a été filtrée sur Darco afin d'éliminer les acides aromatiques (voir tableau 9).

b) Acides de saponification :

L'extrait éthéré (exempt des acides libres) a été saponifié par la potasse méthanolique (2N) durant 3 heures. Après séparation entre eau et éther, la phase aqueuse a été acidifiée : nous avons obtenu 30 % de partie acide en poids de l'extrait.

Une partie de ces acides a subi le même traitement que les acides libres (méthylation, bromuration et passage sur Darco) mais une autre partie a été distillée sous vide (0,2 mm Hg) dans un appareil à boules : nous avons obtenu 4 fractions que nous avons cristallisées dans le méthanol :

I : distille entre 120 et 150° : F 38-44° M = 168 (1 du tableau 9)

II : distille entre 150 et 170° : F 33-44° M = 208 (2 du tableau 9)

III : distille entre 170 et 190° : F 60-65° M = 310 (3 du tableau 9)

IV : distille entre 190 et 220° : F 70-73° M = 395

(le calcul des poids moléculaires a été fait en prenant l'acide benzoïque comme témoin). Après méthylation par le diazométhane nous avons injecté ces fractions dans un chromatographe en phase vapeur.

II - EXTRAIT ALCOOLIQUE

Le pollen épuisé par l'éther est traité par l'alcool : l'extrait obtenu correspond à 24 % du poids du pollen.

De même que pour l'extrait éthéré, nous avons opéré en deux temps :

a) Sur la fraction acides libres obtenue par traitement au carbonate. Les acides après méthylation ont été injectés tels quels, après passage sur Darco et après bromuration (voir tableau 9).

b) Sur la fraction acide obtenue après saponification de la même manière que pour l'extrait éthéré. Cette fraction méthylée a été injectée telle quelle dans l'appareil, après passage sur Darco et après bromuration (voir tableau 9).

Nous avons dans cette fraction, en plus des acides ordinaires, de la nipagine (ester méthylique de l'acide para hydrozy benzoïque) et de l'acide 10 hydroxy décénoïque : pour vérifier si ces deux substances provenaient du pollen lui-même ou bien étaient un apport de la salive des abeilles nous avons fait une étude parallèle sur les acides d'un pollen ramassé à la main.

Nous avions décelé des acides pouvant avoir les mêmes volumes de rétention que certains acides dicarboxyliques impairs ; pour nous rendre compte si ces acides étaient réellement présents nous avons chromatographié 3 g de fraction acide sur 60 g d'acide silicique, les élutions étaient de 30 cm^3 :

1	Benzène	traces	(1 du tableau 9)
2	"	6 mg	(2 ")
3	"	170	(3 ")
4	"	50	(4 ")
5	Benzène-éther 9:1	872	(5 ")
6	"	500	(6 ")
7	"	52	(7 ")
8	Benzène-éther 4:1	0	
9-10	Benzène-éther 1:1	traces	(8 ")
11-12	Ether	0	
13-14	Ether-méthanol 4:1	9	(9 ")
15-16	Ether-a. acétique 2%	traces	(10 ")

Toutes ces fractions ont été estérifiées puis analysées par la chromatographie en phase gazeuse (voir tableau 9) : il ne semble pas y avoir d'acides dicarboxyliques, mais nous avons eu la surprise de trouver de l'acide monocarboxylique en C_{12} dans toutes les fractions. Cet acide est bien de l'acide laurique car par réduction avec $AlLiH_4$ nous obtenons le mono-alcool en C_{12} qui a le même volume de rétention que l'alcool dodécylique authentique.

Nous avons probablement un acide insaturé en C_{18}, le pic correspondant à cet acide disparaissant après bromuration.

B - POLLEN RAMASSE A LA MAIN

EXTRAIT ACETONIQUE

Cet extrait représente 4 % en poids du pollen. Nous avons recherché :

a) Les acides libres : par extraction par le carbonate.

b) Les acides de saponification :

Obtenus après ébullition avec la potasse méthanolique ; nous retrouvons la série ayant les mêmes volumes de rétention que les acides dicarboxyliques impairs : la détermination reste à faire car la chromatographie sur acide silicique décrite plus haut semble en éliminer le présence.

Nous ne retrouvons pas dans ce pollen la nipagine et l'acide 10 hydroxy décénoïque, ce qui semblerait en faveur d'un apport par contamination lors de la confection des pelottes par les abeilles ouvrières.

BIBLIOGRAPHIE

PAIN J., HUGEL M-F., BARBIER M., 1960 - Sur les constituants du mélange attractif des glandes mandibulaires des reines d'abeilles (*Apis mellifica L.*) à différents stades de leur vie. Compt. Rend. Acad. Sciences, *251*, 1 046-1 048.

WERNER E., 1919 - J. Chem. Soc., *115*, 1 096.

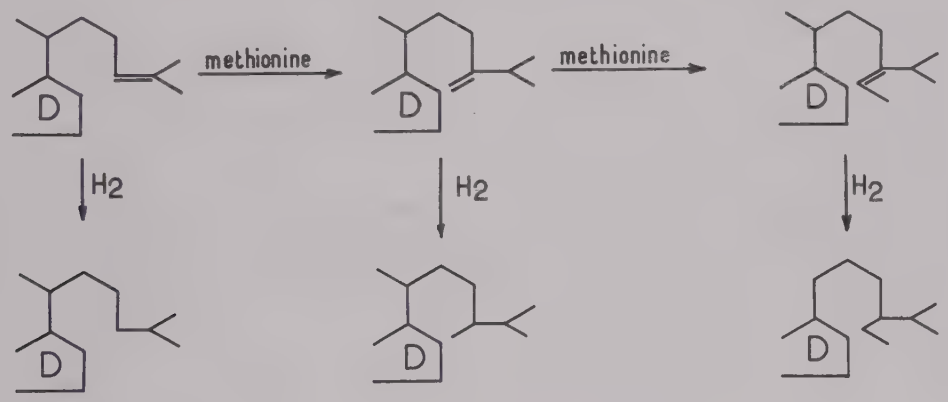
Le pollen, en tant que source de substances naturelles, a fait l'objet d'assez peu de travaux ; parmi ces travaux bien peu ont mené à l'isolement ou à l'identification de composés définis.

L'utilisation de diverses techniques chromatographiques et spectrographiques, en particulier de la spectrométrie de masse, nous ont permis d'étudier avec beaucoup de précision la composition en stérols de pollens purs et mixtes ayant des origines diverses.

Tout au début de notre travail, nous avons isolé des pollens et identifié le 24-méthylène cholestérol, stérol signalé également par Idler et Fagerlund dans les huitres. A cette époque, la présence de ce stérol nous a considérablement surpris, et nous avons décidé de continuer l'analyse des constituants mineurs des fractions stéroliques. Tous les stérols de cette fraction possèdent une structure identique en ce qui concerne la partie cyclique de leur squelette et ne différent entre eux que par leur chaîne latérale. Cette partie de notre travail a grandement été facilitée par les analyses en spectrométrie de masse.

Les pollens contiennent aussi des stérols dont les chaînes sont identiques à celles du cholestérol, desmostérol, campestérol, fucostérol, β-sitostérol et évidemment le 24-méthylène cholestérol. Les pourcentages de ces divers constituants varient suivant l'origine des pollens ; le 24-méthylène cholestérol demeure toutefois le composé dominant.

La présence de cette série de stérols nous a paru représentative d'une série biosynthétique pouvant conduire de la chaîne du desmostérol à celle du fucostérol par double méthylation par la méthionine. Les composés à chaîne latérale saturée proviendraient de la réduction de ceux à chaînes insaturées (la présence du cholestérol parmi les phytostérols serait ainsi explicable). On peut donc concevoir le 24-méthylène cholestérol comme étant un intermédiaire important de cette biosynthèse.

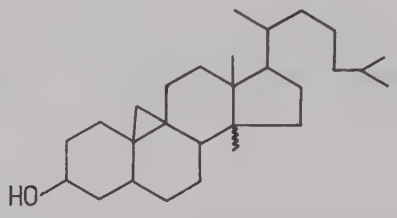


La présence d'une telle série de stérols a été également décelée dans d'autres végétaux (spores de fougères, algues, haricots par exemple), tandis que chez les insectes nous ne trouvons qu'un stérol dominant (24-méthylène cholestérol chez les abeilles, cholestérol chez les grillons et les termites).

Depuis peu cette hypothèse de biosynthèse a été vérifiée de divers côtés, en particulier pour le stigmastérol et le fucostérol. Cependant le stade durant lequel cette transméthylation s'insère n'est pas encore connu ; elle pourrait, par exemple, se situer au niveau du lanostérol ; ainsi s'expliquerait l'existence de composés dérivant du lanostérol par leur structure et possédant un méthylène en position 24 (tel le cycloeucalénol).

Dans une seconde partie de notre travail nous avons étudié la structure chimique d'un nouveau stérol que nous avons appelé le pollinastanol. Cette substance a pu être isolée par cristallisation et chromatographie des eaux-mères de la fraction stérolique d'un pollen mixte. Il se distingue par son point de fusion bas (95°), son pouvoir rotatoire positif, la présence d'un cyclopropane et d'un méthyle supplémentaire dans la partie cyclique du squelette ; ce stérol est totalement saturé.

La coordination des diverses techniques spectrographiques, principalement de RMN et de masse, avec des dégradations chimiques ont permi d'avancer pour le pollinastanol la formule développée suivante :



Seraient également présents, mais en de très faibles quantités, des composés analogues, ne différant entre eux que par les substitutions de leur chaîne latérale ; on aurait donc une série parallèle à celle des stérols précédemment cités et cette constatation serait en faveur de l'hypothèse d'une méthylation de la chaîne latérale par la méthionine au niveau du lanostérol (avant les déméthylations).

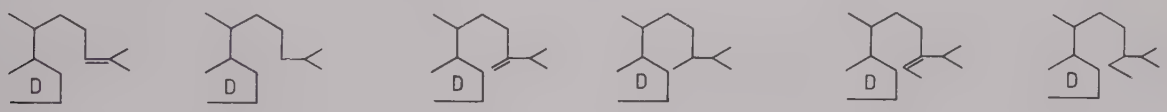
Le pollinastanol ayant été isolé d'un pollen mixte, nous avons entrepris sa recherche dans des pollens purs, ainsi que dans un pollen mixte d'une autre provenance. A ce jour nous n'avons pas réussi à le retrouver. La présence du pollinastanol en quantités importantes dans le pollen mixte que nous avons étudié signifie que l'un des pollens de ce mélange doit le contenir en quantité étonnement élevée.

Nous avons également étudié les fractions acides du pollen de *Zea mays* : celles-ci contiennent essentiellement des acides monocarboxyliques.

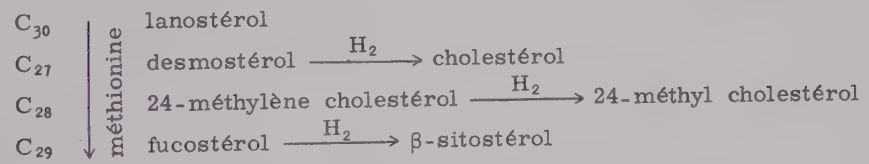
RÉSUMÉ

Nous avons effectué l'analyse de divers pollens, et plus particulièrement l'étude de la composition de leurs stérols. En plus des techniques habituelles, chromatographiques et chimiques, nous avons fait un usage intensif de la spectrométrie de masse ainsi que de la spectrométrie RMN.

Nous avons montré que la fraction insaponifiable des pollens contenait un mélange de stérol en C_{27}, C_{28} et C_{29}, ne différant entre eux que par leur chaîne latérale. Le 24-méthylène cholestérol est le constituant essentiel de ce mélange, les autres stérols possèdent des chaînes latérales identiques à celle du cholestérol, desmostérol, campestérol, fucostérol et β-sitostérol. Les pourcentages de ces divers stérols varient suivant l'origine des pollens.



Ce résultat nous a amené à une hypothèse de biosynthèse des phytostérols. Ceux-ci proviendraient de la méthylation successive de la chaîne latérale du desmostérol par la méthionine. Les stérols du pollen constitueraient ainsi d'une part la série des intermédiaires menant au fucostérol et d'autre part des produits de réduction de la chaîne latérale de ces stérols. Les résultats obtenus récemment par divers laboratoires ont confirmé cette hypothèse :



La chromatographie sur colonne d'acide silicique nous a permis d'isoler une seconde fraction stérolique, contenant un méthyl cyclopropanyl stérol : nous avons proposé pour ce stérol le nom de pollinastanol ; les études chimiques et spectrographiques nous ont conduit à la formule développée suivante :

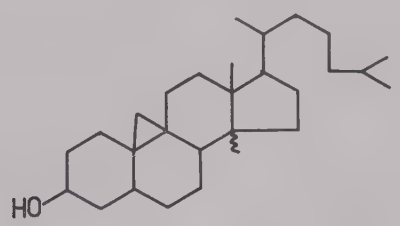


TABLE DES MATIÈRES

Pages

Chapitre I.

Bibliographie sur la chimie du pollen..... 5

- références bibliographiques..... 11

Chapitre II.

Principales techniques utilisées..... 13

- Méthodes chromatographiques..... 13

chromatographie d'adsorption..... 13
chromatographie de partage..... 14
chromatographie en phase gazeuse..... 15

- Méthodes spectrographiques..... 16

résonance magnétique nucléaire..... 16
masse..... 17
dichroïsme circulaire..... 20

- Méthodes analytiques..... 21

réactions colorées..... 23

- Distillation..... 23

- Références bibliographiques..... 23

Chapitre III.

Analyse des stérols du pollen..... 26

Pollen mixte..... 27

Pollen de châtaignier (*Castanea vulgaris*)..... 32

Pollen de noisetier (*Corylus avellana*)..... 32

- partie expérimentale..... 33
- références bibliographiques..... 37

Chapitre IV.

Hypothèse de biosynthèse des stérols végétaux..... 38

- références bibliographiques..... 40

Pages

Chapitre V.

Etude des fractions stéroliques de différents végétaux 41

Colza (*Brassica rapa*) 41

Nitzschia closterium 42

Rhodotorula mucilaginosa 43

- partie expérimentale 44
- références bibliographiques 46

Chapitre VI.

Analyse des stérols d'insectes phytophages 47

termites (*Callotermes flavicollis*) 48

grillons (*Gryllus domesticus*) 49

abeilles (*Apis mellifica L.*) 50

- partie expérimentale 50
- références bibliographiques 51

Chapitre VII.

Le pollinastanol 52

extrait non saponifié 52

extrait saponifié 52

pollinastanol 53
acétate de pollinastanol 54
pollinastanone et dérivés 55
dérivés obtenus après ouverture du cycle propanique 58
résumé 62

- partie expérimentale 66

extrait non saponifié 66
extrait saponifié 68
préparation des i-stérols 71

- références bibliographiques 72

Chapitre VIII.

Etude des acides du pollen de *Zea mays* 74

- partie expérimentale 76
- références bibliographiques 78

Conclusions 79

Résumé 81

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

Vu et approuvé :
Paris, le 29 novembre 1964
Le Doyen de la Faculté des Sciences,
Marc ZAMANSKY

Vu
et Permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie
de Paris,
Jean ROCHE

IMP. LOUIS-JEAN – GAP
Dépôt légal n° 291 – 1964